

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

École Doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

Discipline : Biochimie, chimie et technologie des aliments

Présentée et soutenue par

Erika ZAGO

le 1^{er} décembre 2015

**EXTRACTION ET TRANSFORMATION CHIMIO-
ENZYMATIQUE DE COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ISSUS DE
GRAINES OLEAGINEUSES**

Thèse dirigée par Dr. Pierre VILLENEUVE

Jury

Olivier DANGLES	INRA Avignon	Rapporteur
Michel LINDER	Université de Lorraine, Nancy	Rapporteur
Frédéric FINE	Terres Inovia, Pessac	Membre invité
Jean François ROUS	Avril, Paris	Membre invité
Chahinez AOUF	UMR SPO, INRA Montpellier	Co-encadrante
Pierre VILLENEUVE	UMR IATE, CIRAD, Montpellier	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier le gouvernement du Brésil, le CNPq et le Programme « Ciência sem Fronteiras » pour ma bourse de thèse. Je voudrais remercier le CIRAD pour l'accueil et les UMR IATE et SPO où ces travaux de thèse ont été réalisés. Je voudrais aussi remercier Terres Inovia et le groupe AVRIL, spécialement M. Frédéric FINE et M. Jean-François ROUS, pour le financement de ce projet de thèse.

Merci aux rapporteurs qui ont gentiment accepté d'évaluer ces travaux de thèse : M. Michel LINDER, Mme. Claire DUFOUR et M. Olivier DANGLES (merci encore d'avoir accepté de remplacer Mme. Claire DUFOUR). Je voudrais également remercier tous les membres invités et présents dans le jury de cette thèse : M. Frédéric FINE, M. Jean-François ROUS et M. Florent JOFFRE. Merci de votre collaboration, vos remarques et vos suggestions.

Mon plus grand merci est à mon chef, mon idole Dr. Pierre VILLENEUVE qui a brillamment dirigé cette thèse avec sagesse, gentillesse et une bonne humeur pérenne. Je suis très fière d'avoir fait partie de ton équipe. Merci pour cette opportunité et pour ton attention Pierre, tu es le meilleur chef du monde ! :-)

Je veux aussi remercier ma co-encadrante, Chahinez, pour toutes ses super idées, sa patience et sa gentillesse. Merci pour m'avoir appris pleins de choses au labo (parce que on restait parfois jusqu'à très tard dans la soirée pour finir de purifier quelques produits, et même quand on a du faire une purif sur une colonne en silice car la FLASH était en panne, juste la veille de ton départ aux Pays-Bas. Tu étais là avec moi). Chahinez, tu es ma chimiste préférée. Je t'admire beaucoup !

Merci Jérôme pour le co-encadrement à côté de Chahinez. Vous avez été super ensemble. J'ai beaucoup appris avec votre connivence.

Merci aux docteurs Helene FULCRAND et Eric DUBREUCQ pour la collaboration à ces travaux.

Il y a deux autres personnes sans lesquelles cette Thèse n'aurait pas vu la lumière du jour : Merci infiniment Erwann et Nath !!!

Erwaaaaan, merci pour ta gentillesse, pour m'avoir prêté ton brillant cerveau pour de dizaines de fois et pour ton super aide même pour la rédaction et la soutenance, tes mots d'encouragement, les rigolades, les chocolats... (Tu es quelqu'un de très spécial).

Nathalie Portman, ma française inspiration, celle qui maîtrise tout dans le labo et même un peu de psychologie pour aider des petites thésardes surtout à la fin de leurs thèses. Nath, tu es une super amie. Je vais jamais oublier de nos soirées, les pauses cafés, nos pures d'amour, le concert à Arles (Je t'M!)...

Merci Bruno pour partager tes connaissances avec nous (chimiques, grammaticales, vinicoles et musicales). Tu es très fort en tout ça, mais surtout tu as l'incroyable capacité d'apparaître toujours au bon moment au labo. :-) Tu auras toujours une place spéciale dans mon cœur. Merci aussi pour les chocolats.

Gracias Claudinha, ma sœur mexicaine qui j'ai découvert en France. Mon Dieu, qu'est-ce que les choses ont été plus simples grâce à toi, tes conseils, tes oreilles qui m'ont beaucoup écouté (hehe), ton énergie (toujours prête à quoi que ce soit, un petit verre, un dîner, un grand voyage...). Je remercie l'Univers (comme on disait) de me t'avoir "donné". C'est à vie. Je t'aime corazón !!!

Merci Céline pour ta super bonne énergie, tes mots doux et ta gentillesse. Merci Coralie et Clara pour votre attention et votre amitié. Je veux aussi remercier la première personne qui j'ai connu dans l'équipe : Valérie (je ne vais jamais t'oublier, ton super aide même avant que j'arrive, ton sourire, ta beauté...).

Merci à toute l'équipe Caoutchouc pour la compagnie, les déjeunes, les grillades, les raclettes et les « 4 heures » : Fred, Laurent, Jérôme, Karim (merci pour ta bonne

humeur, tes conseils, ta gentillesse et ton amitié), Christine (merci pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble, surtout les repas et les soirées), Guilherme (obrigada pela força desde o princípio piá!).

Merci Georges (spécialement pour ma chanson de thèse!!!), Michel, Maria, Mickael, Marlènitá (querida), Erica Salas, Sevim.

Merci à tous mes amis thésards : Santi, Vicent, Emna, Natalia (merci pour l'amitié, l'appartement et pour toutes les bonnes choses et les personnes merveilleuses qui tu m'as fait connaître à Montpellier), Adriaan, Lizeth, Mélanie, Sophie, Mariana, Sébastien, Fon et Oil (you are so lovely), Emília, Charlotte, Christelle (merci pour tes conseils et pour ton amitié), Paul Alain (le sourire contagieux), Anne Helene, Veronica, Andres, Santiago, Aurélien "Dr. de la Torre".

Merci aux collègues de SPO : Laurent, Guillaume et Lucas (c'était plus rigolo de faire de manips à coté de vous, merci pour l'accueil).

Merci à mes copines Tassia, Rebecca, Laureline, Lais et Maíra (1er comité de thèse, obrigada por ter me ouvido).

Merci Alexandre Lima pour tout ton aide. Grace à toi j'ai pu commencer tout ça avec l'esprit tranquille. Merci aussi à Manuel et Maria do Amparo pour m'avoir accueilli à Lyon et pour la gentillesse et attention. Muito obrigada!

Un très grand merci à vous qui avez été ma famille pendant ces trois ans en France : Cédric (je t'aime, je t'aime, je t'aime!!!), "Dorinha" (je te veux toujours dans ma vie querida), Noé (merci pour m'avoir montré la beauté de l'Alsace et de la Provence), Mathieuzinho, Ramsés, Olman.

Obrigada meus amores : Kelly, Ana Cursino, Gabriel, Fabio, Vannia (foi incrível ter dividido esse momento com vocês!), Marina e Chris, Gardner, Anny, Alvinho, Mãe Marta, Cami e Manu, Desi, Monique, Enio.

Obrigada pelo incentivo, ajuda e suporte: Professora Nadia KRIEGER, Thais SALUM, Professora Araceli, Sr. Wanderley (ULTRA), Tia Jô, David e Julinho (pela inspiração).

Obrigada infinitamente à minha família por estar ao meu lado em todos os momentos: minha mãe Isabel, meu pai Eduardo, meu irmão Rodrigo (e ao Sidney que me ajudou a escrever a tese :-P), Mimi e mãe Jô, Ronda. Eu amo vocês!

Finalment je voudrais remercier quelqu'un de très spécial qui a été là en tous les moments, de joies, de pleurs, de plaintes, de victoires et même pour lire plusieurs chapitres de ce manuscrit de thèse et d'autres paragraphes de publis etc. Merci beaucoup pour ton aide et ton support pendant tous ces moments. Ta présence a été très importante pour moi. Dr. BAUDOUIN, meu amor, tu as été le meilleur qui ma thèse m'a apporté.

Et à tous ceux qui ont fait partie de cette aventure : Merci beaucoup!

Intelligence is the ability to adapt to change.

Stephen Hawking

À Nathalie, Erwann
et Frédéric.

Ces travaux de thèse ont été réalisés au CIRAD au sein de l'équipe Biotechnologie Microbienne et Enzymatique des Lipides et des Agropolymères de l'UMR IATE et de l'UMR SPO.

Mots-clés : composés phénoliques, colza, canolol, transformation chimio-enzymatique, lipophilisation, métathèse croisée.

Le colza est l'oléagineux le plus cultivé de l'Union Européenne. Son tourteau constitue une source de canolol (4-vinylsyringol), un piègeur de radicaux libres aux nombreuses propriétés biologiques et une molécule plate-forme potentielle dans le domaine des polymères et de la chimie fine. Ce vinylphénol provient de la décarboxylation de l'acide sinapique, lui-même issu de l'hydrolyse de la sinapoylcholine (sinapine) le principal composé phénolique du colza. Le premier objectif de cette thèse a donc consisté à promouvoir sa formation dans le tourteau de colza en évaluant l'influence de l'hydratation et des traitements thermiques. Par la suite, le canolol **1** et le 4-vinylguaiacol **2** ont été lipophilisés par voie chimio-enzymatique afin d'en améliorer le caractère amphiphile et l'activité antioxydante (AO). L'addition électrophile de peracides aliphatiques (C2-C18), formés *in situ* par la lipase CALB, sur leur liaison vinylique a été testée. Alors que **1** s'est avéré inerte, **2** a conduit à la formation d'hydroxyesters dont l'AO a été évaluée. Les hydroxyesters à chaînes alkyles de 2 à 8 carbones ont montré une AO supérieure à celle de **2**. La dernière partie de la thèse a été consacrée à la synthèse de précurseurs de résine époxy, substitués potentiels de DGEBA (diglycidyl éther de bisphénol-A). Deux voies de dimérisation ont été étudiées : (i) la métathèse croisée des dérivés glycidylés des composés **1**, **2** et de l'eugénol **3** et (ii) la O-alkylation de **3** avec le dibromopentane, suivie de l'époxydation enzymatique du dimère allylique. Une large gamme de dimères phénoliques a été ainsi obtenue avec de bons rendements, et une haute diastéréosélectivité pour les produits de métathèse.

EXTRACTION AND CHEMO-ENZYMATIC TRANSFORMATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM OLEAGINOUS SEEDS

Keywords: phenolic compounds, rapeseed, canolol, chemo-enzymatic transformation, lipophilization, cross metathesis

Rapeseed is the main cultivated oleaginous plant within UE. Its meal is a source of canolol (4-vinyl syringol), a potent radical scavenger with numerous biological activities and a potential platform molecule in the polymer and fine chemical sectors. This vinylphénol results from the decarboxylation of sinapic acid, this latter arising from hydrolysis of sinapoylcholine (sinapine) the main phenolic in rape seeds. The first objective of this work was to determine the main factors, among hydration and roasting treatments, which can promote the formation of canolol during meal processing. Then, canolol **1** and 4-vinylguaiacol **2** were chemo-enzymatically lipophilized in order to enhance their amphiphilicity and antioxidant activity (AO). The electrophilic addition of aliphatic peracids (C2 to C18), *in situ* generated from their corresponding acids by *Candida antarctica* lipase B, was assessed. While **1** proved to be inert towards peracids, compound **2** led to the formation of hydroxy-ester derivatives whom AO was evaluated. The results showed that hydroxy-esters with alkyl chain of 2 to 8 carbons exhibited higher AO than that of their precursor **2**. The last part of this work was dedicated to the synthesis of epoxy resin precursors as potential BADGE substitutes (Bisphenol-A diglycidyl ether). Two strategies of dimerization were studied: (i) the cross metathesis of glycidylated derivatives of **1**, **2** and eugenol **3**, and (ii) the O-alkylation of **3** with dibromopentane followed by the biocatalyzed epoxidation of the resulting allylic dimer. A large set of phenolic dimers was thus obtained in good yields, with a high diastereoselectivity concerning cross metathesis products.

TABLE DES MATIERES

Valorisation des travaux de thèse.....	17
Liste des figures et tableaux.....	19
Liste des abréviations	23
INTRODUCTION GENERALE.....	27
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	33
I. LA FILIERE OLEAGINEUSE.....	33
II. LE COLZA.....	34
II.1 PRODUCTION ET COMPOSITION.....	34
II.2 LE GATEAU ET LE TOURTEAU DE COLZA	36
III. LES COMPOSES PHENOLIQUES	39
III.1 EXTRACTION DES COMPOSES PHENOLIQUES	41
III.2 APPLICATIONS DES COMPOSES PHENOLIQUES NATURELS	44
III.3 COMPOSES PHENOLIQUES DU COLZA : NATURE ET PROPRIETES.....	45
III.3.1 La Sinapine.....	46
III.3.2 L'acide sinapique	47
III.3.3 Le Canolol.....	47
IV. REACTIONS DE FONCTIONNALISATION DES COMPOSES PHENOLIQUES.....	52
IV.1 AMELIORATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE PAR REACTIONS DE LIPOPHILISAT ...	52
IV.2 FORMATION DE PRECURSEURS DE BIOPOLYMERES.....	54
IV.2.1 Le bisphénol-A (BPA)	54
IV.2.2 Les résines époxy	56
CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	67
I. REACTIFS.....	67

II.	METHODES PREPARATIVES ET ANALYTIQUES	68
II.1	CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET DENSITOMETRIE	68
II.2	PURIFICATION DES PRODUITS PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH SUR GEL DE SILICE ..	68
II.3	ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE.....	69
II.4	ANALYSE PAR UPLC-MS	69
II.5	ANALYSE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)	70
II.6	ANALYSES ELEMENTAIRES	70
II.7	ANALYSES STATISTIQUES.....	71
III.	MATIERES PREMIERES ET TRAITEMENTS APPLIQUES.....	75
III.1	DESCRIPTION ET CLASSIFICATION DES TRAITEMENTS INDUSTRIELS APPLIQUES AUX ECHANTILLONS DE TOURTEAU DE COLZA	75
III.1.1	Etape d'hydratation.....	77
III.1.2	Traitements thermiques	77
III.2	CARACTERISATION DES ECHANTILLONS DE TOURTEAU DE COLZA	78
III.2.1	Teneur en eau	78
III.2.2	Teneur en huile	79
III.2.3	Extraction des composés phénoliques	79
III.2.4	Teneur en composés phénoliques totaux.....	80
III.2.5	Teneurs en sinapine, acide sinapique et canolol.....	81
IV.	SYNTHESE DU CANOLOL ET DU 4-VINYLGUAIACOL A PARTIR DE LEURS HYDROXYBENZALDEHYDES CORRESPONDANTS	85
V.	Réactions de Lipophilisation	89
V.1	PROTECTION DE L'HYDROXYLE PHENOLIQUE PAR SILYLATION.....	89
V.2	LIOPHILISATION DU PRODUIT SILYLE	90

V.3	DEPROTECTION DU GROUPEMENT HYDROXYLE PHENOLIQUE : ELIMINATION DU GROUPEMENT SILYLE	91
V.4	EVALUATION DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE DES PRODUITS DE LIPOPHILISATION PAR LE TEST CAT (CONJUGATED AUTOXIDIZABLE TRIENE ASSAY).....	99
VI.	REACTIONS DE METATHESE	103
VI.1	DIMERISATION DE L'EUGENOL 8 PAR METATHESE CROISEE	103
VI.2	PROTECTION DE L'HYDROXYLE PHENOLIQUE DU 4-VINYLGUAIACOL 2 PAR O-METHYLATION ET DIMERISATION DU PRODUIT OBTENU	104
VI.2.1	Méthylation du 4-vinylguaiacol.....	104
VI.2.2	Réaction de métathèse du 4-vinylguaiacol méthylé 7.....	104
VI.3	GLYCIDYLATION DU CANOLOL 1, DU 4-VINYLGUAIACOL 2, ET DE L'EUGENOL 8	105
VI.4	DIMERISATION DES COMPOSES PHENOLIQUES GLYCIDYLES PAR METATHESE CROISEE.....	108
VII.	DIMERISATION DE L'EUGENOL PAR O-ALKYLATION ET EPOXYDATION DES DOUBLES LIAISONS ALLYLIQUES.....	113
VII.1	DIMERISATION DE L'EUGENOL PAR O-ALKYLATION AVEC LE 1,5-DIBROMOPEN ...	113
VII.2	EPOXYDATION CHIMIO-ENZYMATIQUE DES DOUBLES LIAISONS ALLYLIQUES	114
	CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	119
I.	EFFET DES TRAITEMENTS THERMIQUES, DE L'HYDRATATION ET DU TEMPS D'INCUBATION SUR LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX ET INDIVIDUELS (SINAPINE, ACIDE SINAPIQUE ET CANOLOL) DES TOURTEAUX DE COLZA	119
I.1	PROCEDES INDUSTRIELS DE TRITURATION DES GRAINES DE COLZA.....	119
I.2	CARACTERISATION DES TOURTEAUX DE COLZA	121
I.2.1	Teneur en eau et en huile	121
I.2.2	Teneur en composés phénoliques totaux	124

I.2.3 Teneur en composés phénoliques individuels : sinapine, acide sinapique et canolol	127
I.3 CONCLUSION	134
II. SYNTHÈSE DU CANOLOL ET DU 4-VINYLGUAIACOL À PARTIR DES HYDROXYBENZALDEHYDES CORRESPONDANTS	136
III. REACTIONS DE FONCTIONNALISATION	140
III.1 EFFET DE LA LIPOPHILISATION DES VINYLPHÉNOLS SUR LEUR ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE	140
III.1.1 Lipophilisation par addition de peracides, générés <i>in situ</i> en présence de la lipase B de <i>Candida antarctica</i>	141
III.1.2 Évaluation de la capacité antioxydante par la méthode des Triènes Conjugués Autoxydables (CAT)	152
III.1.3 Conclusion	155
III.2 SYNTHÈSES DE PRE-POLYMERES EPOXY BIOSOURCES PAR REACTIONS DE DIMERISATION.....	156
III.2.1 Dimérisation par métathèse croisée	157
III.2.2 Synthèse de dimères glycidylés de l'eugénol par O-alkylation avec le dibromopentane et époxydation des doubles liaisons allyliques	170
III.2.3 Conclusions	173
IV. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	177
V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	185

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Brevets :

AOUF C., LECOMTE J., ZAGO E., VILLENEUVE P., FINE F., FULCRAND H., ROUS J.F.

Dimères polyaromatiques. Déposé en France en 2015.

AOUF C., LECOMTE J., ZAGO E., VILLENEUVE P., FINE F., FULCRAND H., ROUS J.F.

Dimères polyaromatiques glycidylés. Déposé en France en 2014.

Publications :

ZAGO, E.; LECOMTE, J.; BAROUH, N.; AOUF, C.; FULCRAND H.; CARRE, P.; FINE, F.; VILLENEUVE, P.

Influence of rapeseed meal treatments on its total phenolic content and composition in sinapine, sinapic acid and canolol. (Zago et al., 2015b)

Industrial Crops and Products 76 (2015) 1061–1070

ZAGO, E.; DURAND, E. ; LECOMTE, J.; BAROUH, N. ; VILLENEUVE, P. ; AOUF, C.
Synthesis of Lipophilic Antioxidants by a Lipase B Catalysed Addition of Peracids to the Double Bond of 4-Vinyl-2-Methoxyphenol. (Zago et al., 2015a)

Journal of Agricultural and Food Chemistry 63 (2015), 9069–9075

ZAGO, E.; DUBREUCQ, E.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P.; FINE, F.; FULCRAND, H.; AOUF, C.

Synthesis of bio-based epoxy pre-polymers from natural allyl- and vinyl phenols and the estimation of their affinity to the estrogen receptor α by molecular docking.

Article soumis à Biomacromolecules.

Communications orales et par affiche présentées à des congrès internationaux :

ZAGO, E.; LECOMTE, J.; BAROUH, N.; FULCRAND, H.; CARRE, P.; FINE, F.; AOUF, C.; VILLENEUVE, P.

Influence of Thermal and Enzymatic Treatments of Rapeseed Meal on Canolol Production and its Conversion into Potential Polymer Precursors.

106th AOCS Annual Meeting and Industry Showcases, 3-6 mai, Orlando, Florida, ETATS-UNIS

ZAGO E.; AOUF C.; FULCRAND H.; FINE F.; LECOMTE J.; VILLENEUVE P.

Production of bio-based epoxy pre-polymers as substituent of bisphenol-A diglycidyl ether (DGEBA).

BIOREFINERY FOR FOOD & FUELS & MATERIALS, 15-17 juin, Montpellier, FRANCE

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

Figure 1. Principaux pays producteurs d'oléagineux dans l'Union Européenne en...	34
Figure 2. Composition chimique des graines de colza	35
Figure 3. Distribution des cultures de colza en France.....	36
Figure 4. Composition massique chimique du tourteau de colza	37
Figure 5. Structure chimique des principaux acides et esters phénoliques dans	40
Figure 6. Structure chimique des principaux flavonoïdes du règne végétal	41
Figure 7. Hydrolyse de la sinapine en acide sinapique.	46
Figure 8. Structure chimique du canolol (2,6-diméthoxy-4-vinylphénol).....	47
Figure 9. Réaction d'hydrolyse de la sinapine en acide sinapique, puis décarboxylation de ce dernier en canolol.	48
Figure 10. Structure chimique de la molécule de bisphénol-A	54
Figure 11. Structure chimique de la molécule de DGEBA.....	56
Figure 12. Représentation du mécanisme général de métathèse proposé par Chauvin et validé par Schrock et Grubbs	58
Figure 13. Catalyseurs de la réaction de métathèse : (A) Schrock, (B) Grubbs (1 ^{re} génération) et (C) Grubbs (2 ^e génération).	59
Figure 14. Dimères possibles obtenus par métathèse croisée de deux oléfines terminales	60
Figure 15. Réaction de O-alkylation d'un phénol avec un n-dibromoalcane.	61
Figure 16. Stratégies de glycidylation et d'époxydation des composés phénoliques.	62

Figure 17. Représentation de la réaction d'époxydation d'une oléfine catalysée par une lipase en présence de peroxyde d'hydrogène et d'acide carboxylique.....	63
Figure 18. Presse MBU 20, capacité de 100 kg.h ⁻¹ . Processus de pressage mécanique à froid des graines de colza. Sortie de l'huile brute.....	75
Figure 19. Les 15 échantillons de colza étudiés.	76
Figure 20. Réaction de réduction du molybdène (réactif de Folin) par l'acide sinapique, en présence de carbonate de sodium.	80
Figure 21. Chromatogrammes de la solution contenant les étalons de canolol, sinapine et acide sinapique à (A) 273 nm et (B) 310 nm.....	81
Figure 22. Structure chimique du 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH).	100
Figure 23. Structure chimique du Trolox.....	102
Figure 24. Processus industriel de pressage des graines de colza et production de tourteau.....	120
Figure 25. Schéma décrivant les différents traitements subis par les échantillons.	121
Figure 26. Teneur en eau des échantillons étudiés (% , m/m)	123
Figure 27. Teneur en huile dans les échantillons de tourteau de colza.....	124
Figure 28. Composés phénoliques totaux dans les échantillons délipidés.....	125
Figure 29. Bilan molaire entre la sinapine (□), l'acide sinapique (■) et le canolol (■) dans les échantillons délipidés.	128
Figure 30. Réaction d'hydrolyse de la sinapine en acide sinapique et sa decarboxylation en canolol.	129
Figure 31. Mécanisme général proposé pour la synthèse des vinylphénols à partir de leurs aldéhydes correspondants.....	138

Figure 32. Réaction de synthèse du canolol et du 4-vinylguaiacol à partir respectivement du syringaldéhyde et de la vanilline.	139
Figure 33. Mécanisme de la réaction d'addition électrophile du <i>m</i> -CPBA sur la liaison vinylique de l'alcool O-benzyle coniférylique.	142
Figure 34. Protection d'un alcool (ROH) en utilisant le chlorure de <i>tert</i> -buthyldiméthylsilyle en présence d'imidazole	144
Figure 35. Protection de l'hydroxyle phénolique du 4-vinylguaiacol et du canolol par silylation au chlorure de N- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle.....	144
Figure 36. Elimination du groupement N- <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle assistée par l'ion fluorure en milieu acide.....	145
Figure 37. Estérification du composé 4 suivie de la déprotection de son groupement hydroxyle.....	146
Figure 38. Mécanisme de lipophilisation de la double liaison vinylique du 4-vinylguaiacol silylé 4 et formation d'hydroxyesters isomères.	147
Figure 39. Structures chimiques des hydroxyesters phénoliques	149
Figure 40. Valeurs CAT du 4-vinylguaiacol (□) et des hydroxyesters phénoliques portant un hydroxyle primaire libre (■) ou un hydroxyle secondaire libre (▒)	153
Figure 41. Structures chimiques de 1, 2 et 8.	158
Figure 42. Métathèse croisée du composé 8.....	159
Figure 43. Transformation du chlorure de ruthénium en complexe alkoxyde.....	160
Figure 44. Protection de l'hydroxyle phénolique du composé 2 par O-méthylation suivie de la réaction de métathèse croisée.....	161
Figure 45. Schéma de rétrosynthèse du dimère diglycidylé de l'eugénol.....	162
Figure 46. Réactions de glycidylation des composés 1, 2 et 8.....	162
Figure 47. Produits obtenus par métathèse croisée des composés 9, 10 et 11.....	164

Figure 48. Les spectres RMN ^1H des composés de 14, 13 et 17 illustrant les signaux de liaisons oléfiniques.....	166
Figure 49. Mécanisme d'isomérisation d'un alcène en présence de ruthénium via formation de complexes d'hydruure de p-allyle	167
Figure 50. Isomérisation partielle de 11 en 11a, en présence du catalyseur de Grubbs II (Ru-catalyseur).....	168
Figure 51. Réaction de O-alkylation de l'eugénol 8 avec le 1,5-dibromopentane. ..	171
Figure 52. Mécanisme de la réaction d'époxydation de Prilezhaev en présence de peracides générés <i>in situ</i> par une lipase	172
Figure 53. Synthèse chimio-enzymatique du dimère 19.....	172

Tableaux :

Tableau 1. Exemples de méthodes d'extraction des composés phénoliques provenant de différentes sources végétales décrites dans la littérature.....	43
Tableau 2. Description des échantillons.....	76
Tableau 3. Teneurs en sinapine, acide sinapique, canolol et composés phénoliques totaux (TPC) dans les échantillons déshuilés.....	130
Tableau 4. Produits d'addition électrophile de peracides, générés <i>in situ</i> à partir des acides carboxyliques correspondants, sur le composé 4.	148
Tableau 5. Métathèse croisée des dérivés glycidylés 9, 10 et 11.	163

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAPH : 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride

ADMET : métathèse de diènes acycliques (en anglais : *Acyclic diene metathesis*)

ASC : Aire sous la courbe

BPA : Bisphénol-A

CAT : Test des triènes conjugués autoxydables (en anglais : *Conjugated autoxidizable triene assay*)

CCM: Chromatographie sur couche mince

CETIOM : Centre Technique Interprofessionnel des Oléagineux Métropolitains

CMO: Cuisson assistée par micro-ondes

CMOVS: Cuisson assistée par micro-ondes avec injection de vapeur surchauffée

CS: Cuisson simple

CSVs: Cuisson simple avec injection de vapeur surchauffée

DGEBA : diglycidyl éther de bisphénol-A

DJT : Dose journalière tolérable

DPPH : Radical 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl libre

EAS : Equivalents en acide sinapique

EFSA : Autorité Européenne de Sécurité Alimentaire (en anglais : *European Food Safety Agency*)

EROs : Espèces réactives de l'oxygène

H0: Sans hydratation ni incubation

H18: Hydratation suivie de dix-huit heures d'incubation

H2: Hydratation suivie de deux heures d'incubation

MC : Métathèse croisée

m-CPBA : Acide *mé*ta-chloroperbenzoïque

MS : Masse sèche

ONIDOL : Organisation Nationale Interprofessionnelle Des graines et fruits
OLéagineux

PBS : Tampon phosphate

PET : Poly(éthylène téréphtalate)

PROLEA : Plateforme de communication de la filière des huiles et protéines
végétales françaises

RCM : Métathèse de fermeture de cycle (en anglais : *Ring-closing metathesis*)

SD : Ecart type (en anglais: *standard deviation*)

SOFIPROTEOL : Société financière de la filière des oléagineux et protéagineux

TBAF : Fluorure de tétra-*N*-butylammonium

TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle

TPC : Teneur en composés phénoliques totaux (en anglais : *Total Phenolic Content*)

UPLC : Chromatographie liquide ultra haute performance (en anglais : *Ultra Performance Liquid Chromatography*)

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Le colza (*Brassica napus* L.) est une plante oléagineuse de la famille des brassicacées cultivée pour son huile dont les applications vont de l'alimentation humaine, à la production de biocarburants, de polymères, ou de lubrifiants. L'huile, qui représente environ 40% de la masse totale de la graine est extraite au cours du processus de trituration. Le tourteau, qui est le coproduit (jusqu'à 58%, m/m de la graine) de ce processus est riche en protéines, en fibres et en composés mineurs dont certains éléments minéraux. En 2014, plus de 24 millions de tonnes de graines de colza ont été produites dans l'Union Européenne, la France étant le plus grand producteur, avec près de 5 millions de tonnes (CETIOM, 2013; CETIOM, 2014; Fine *et al.*, 2015; TERRES-INOVIA, 2015). Ainsi, environ 2 millions et demi de tonnes de tourteau de colza ont été produites en France en 2014 (FEDIOL), l'alimentation animale constituant leur unique débouché. Dans un contexte de durabilité des filières agricoles et de chimie verte, les coproduits et déchets agricoles suscitent un intérêt croissant en raison des volumes importants qu'ils représentent et de la diversité des molécules d'intérêt qu'ils renferment. Les tourteaux d'oléagineux, et tout particulièrement celui du colza, contiennent notamment des quantités significatives de composés phénoliques potentiellement valorisables dans de nombreux secteurs comme l'agroalimentaire, la santé, la cosmétique ou la chimie fine.

Omniprésents dans le règne végétal, les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans les mécanismes de défense et de protection contre les agressions extérieures comme les rayons ultraviolet, les agents pathogènes ou les parasites (Dewick, 2001). Ces composés, qui représentent environ 40% du carbone de la biomasse terrestre, ont une structure extrêmement variable qui va du simple cycle aromatique substitué, comme dans le cas des acides phénoliques, aux polymères complexes de haut poids moléculaire de type lignine ou tanins condensés. Les composés phénoliques apportés par l'alimentation (fruits, légumes, céréales) sont aujourd'hui reconnus comme des éléments essentiels dans la lutte contre le stress oxydatif à l'origine de nombreuses pathologies comme le cancer, le diabète ou les maladies cardiovasculaires. Ce sont également d'excellents conservateurs en agroalimentaire où ils peuvent remplacer

avantageusement certains agents de synthèse comme le BHT, le BHA ou le BTHQ (Oliveira *et al.*, 2014; Sanda Vladimir-Knežević *et al.*, 2012). A côté des aspects nutritionnels et technologiques liés au caractère antioxydant, la réactivité apportée par le(s) cycle(s) aromatique(s) fait des composés phénoliques naturels des réactifs et intermédiaires de synthèse particulièrement intéressants même si, à ce jour, peu d'entre eux connaissent un développement industriel (vanilline, gaïacol, acide salicylique, liquide de péricarpe de noix de Cajou, tanins et lignine...)

Le composé phénolique le plus abondant dans la graine de colza est la sinapine (ester de choline de l'acide sinapique) qui peut représenter jusqu'à 80% des composés phénoliques (Kozłowska *et al.*, 1990). Pendant la germination des graines, une partie de la sinapine peut être hydrolysée en acide sinapique (Fang *et al.*, 2012; Iwanowska *et al.*, 1994; Tzagoloff, 1963). En 2003, Koski *et al.* ont mis en évidence la formation d'un vinylphénol par décarboxylation de l'acide sinapique au cours du procédé de trituration des graines. Cette molécule nommée canolol (2,6-diméthoxy-4-vinylphénol) s'est avérée être un puissant piègeur de radicaux libres aux propriétés anti-cancérigènes et antimutagènes potentielles (Cao *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013; Kuwahara *et al.*, 2004). Cependant, le canolol est une molécule relativement polaire comme en témoigne sa réactivité 3,6 fois plus rapide en milieux aqueux que dans les milieux lipidiques (Galano *et al.* (2011)). La modification de sa structure, sans altérer le cycle phénolique responsable de son activité antiradicalaire, pourrait accroître son efficacité comme antioxydant dans des systèmes lipidiques hétérogènes. L'une des stratégies visant à améliorer cette efficacité consiste à ajuster la polarité du composé par le greffage de chaînes aliphatiques grasses (réaction de lipophilisation). Il a en effet été montré qu'une modification adéquate de la balance hydrophile/lipophile conduisait à de nouvelles molécules bioactives (dénommées phénolipides) dont l'activité était significativement améliorée par rapport aux molécules initiales (Laguerre *et al.*, 2014).

Si de nombreux composés phénoliques ont été lipophilisés à ce jour (acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques, flavonoïdes.), il n'existe en revanche aucune donnée concernant l'utilisation des vinylphénols comme précurseurs de phénolipides.

Par ailleurs, de par leur structure chimique et leur réactivité, les vinylphénols constituent des molécules plateformes potentiellement intéressante pour les secteurs de la chimie fine et/ou des matériaux. Dans le domaine des résines époxy notamment, la synthèse de précurseurs de type « dimères aromatiques », substitués potentiels du Bisphénol-A (BPA) ou de son dérivé diglycidylé (DGEBA), peut être envisagée à partir de vinylphénols comme le canolol et le 4-vinylguaiacol mais également d'allylphénols tel que l'eugénol, tous issus de ressources renouvelables abondantes.

Ce manuscrit de thèse comporte trois chapitres. Le premier fait référence à l'étude bibliographique, comprenant une introduction sur la filière des oléagineux en Union Européenne et spécifiquement en France, en accordant une attention particulière au colza. Cette partie aborde également l'importance des composés phénoliques naturels comme source de nouveaux précurseurs de polymères et potentiels substitués de BPA et DGEBA. Ce chapitre évoque également l'importance des composés phénoliques naturels dans la synthèse de nouvelles molécules. Enfin, les réactions de fonctionnalisation de ces composés : métathèse, O-alkylation et lipophilisation sont présentées.

Dans le deuxième chapitre la partie expérimentale est présentée avec d'abord la description (i) des procédés de traitement de tourteaux de colza appliqués à l'échelle pilote par Terres Inovia (ex CETIOM) et (ii) des techniques d'extraction et de caractérisation des composés phénoliques d'intérêt. Les réactions de lipophilisation du canolol et du 4-vinylguaiacol ainsi qu'une description détaillée de la méthode CAT, utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des phénolipides issus du 4-vinylguaiacol sont ensuite décrites. Enfin, les différentes voies de synthèse de précurseurs de résines époxy à partir du canolol, du 4-vinylguaiacol et de l'eugénol, viendront clore ce chapitre.

Le dernier chapitre est consacré à la partie des résultats obtenus et une discussion sur (i) l'influence de l'hydratation et des traitements thermiques du tourteau de colza sur les teneurs en composés phénoliques et plus spécifiquement sur le canolol, (ii) l'effet des réactions de lipophilisation sur l'activité antioxydante du 4-vinylguaiacol et finalement, (iii) la réactivité du canolol, du 4-vinylguaiacol et de l'eugénol lors de la

réaction de métathèse, la réaction de O-alkylation de l'eugénol et sa particularité comme allylphénol.

Une conclusion générale est présentée à la fin du troisième chapitre de ce document en mettant l'accent sur les principaux résultats obtenus pendant ces travaux de thèse ainsi que les perspectives de poursuite de ce projet.

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA FILIERE OLEAGINEUSE

Les oléagineux sont des plantes dont les graines contiennent une huile pouvant être extraite par des procédés appropriés. Cette huile constitue les lipides de réserve nécessaires à la germination de la plante.

En Europe, les principales cultures de plantes oléagineuses sont le colza, le tournesol et l'olive. À l'échelle internationale, le palmier à huile (*Elaeis guineensis*) est la première source d'huile végétale au monde, suivie par le soja (*Glycine max*) et le colza (TERRES-INOVIA, 2015). Environ 70% de la production d'huiles végétales est destinée à la consommation humaine, plus de 10% à la production de biocombustibles et 15% à d'autres applications (oleochimie, alimentation animale) (Mielke, 2013). Elles peuvent être également utilisées dans des formulations cosmétiques, pharmaceutiques, lubrifiantes, ou bien comme solvants, encres, détergents, polymères etc.

Depuis les années 70, la France s'est dotée d'une filière des huiles et protéines végétales : PROLEA. Elle est constituée par l'ONIDOL (Organisation nationale interprofessionnelle des oléagineux), Terres Inovia (Le centre technique des oléagineux et protéagineux) et SOFIPROTEOL (Société financière de la filière des oléagineux et protéagineux). Aujourd'hui, la filière des oléagineux fait face à un nouveau défi qui consiste à développer des nouvelles technologies de transformation et valorisation. Ses objectifs sont d'améliorer la qualité des coproduits afin de réduire la dépendance en protéines de soja, contribuer au développement d'une agriculture plus durable et conduire à une meilleure qualité de la viande à travers une meilleure alimentation des animaux. Les acteurs de cette filière sont les producteurs, les usines de transformation, les acteurs de la commercialisation et le secteur de la recherche et développement.

Premier producteur de l'Union Européenne, la France produit 7 millions de tonnes d'oléagineux, dont 5 millions et demi de tonnes de colza (Figure 1).

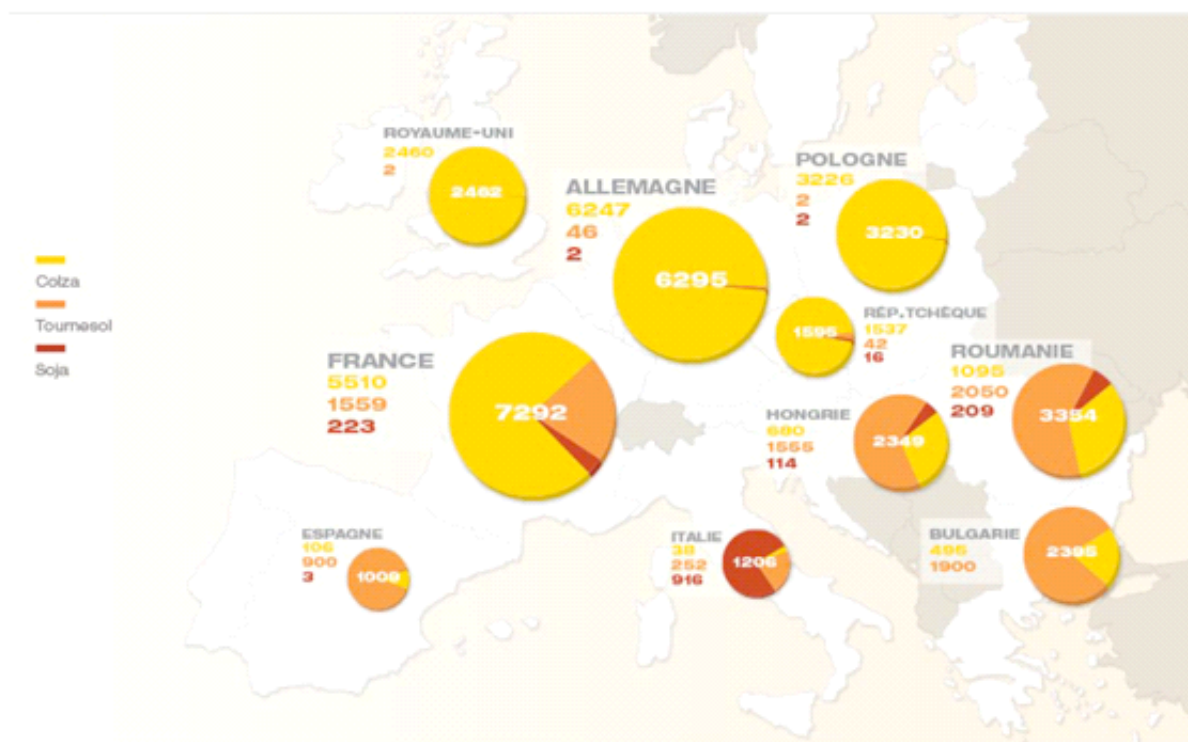


Figure 1. Principaux pays producteurs d'oléagineux dans l'Union Européenne en 2014. Source : ONIDOL. (TERRES-INOVIA, 2015).

II. LE COLZA

II.1 PRODUCTION ET COMPOSITION

Le colza (*Brassica napus* L.) est une espèce de plante oléagineuse, de la famille des brassicacées (anciennement nommées crucifères, du latin *Cruciferae* : « en croix », en raison de ses feuilles en forme de croix). Il provient du croisement naturel entre un chou (*Brassica oleracea* L.) et une navette (*Brassica rapa* L.). Selon des archives historiques, le colza est mentionné dans des textes sanskrits datant de 2000 à 1500 ans avant Jésus-Christ et dans des écrits grecs, romains et chinois remontant aux années 500 à 200 avant Jésus-Christ. Du fait de sa forte teneur en lipides ($\geq 40\%$, m/m) (Unger, 1990), le colza est principalement cultivé pour son huile (Figure 2).

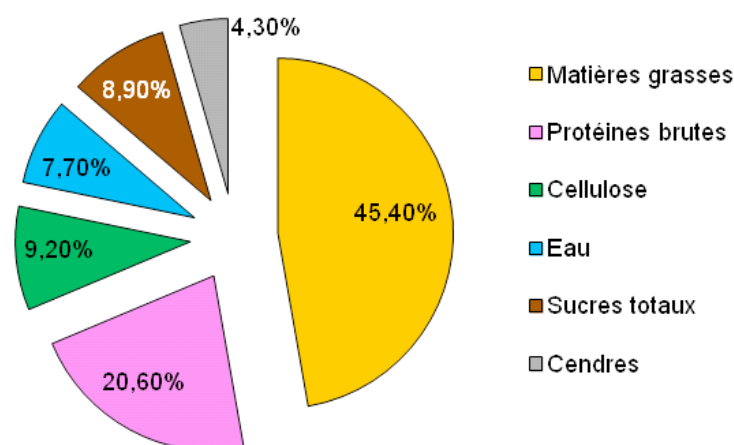


Figure 2. Composition chimique des graines de colza. Source: « Le colza, de la plante à ses produits ». (Annual Publication CETIOM, 2012; CETIOM, 2014).

L'huile de colza est constituée de 98% de triesters d'acides gras. Les 2% restant sont riches en stérols et tocophérols (dont la vitamine E). La composition en acides gras de l'huile de colza utilisée pour l'alimentation humaine est bonne pour l'équilibre de l'ensemble des matières grasses que nous consommons quotidiennement (Annual Publication CETIOM, 2012). En effet, l'huile de colza est constituée par 58% (m/m) d'acide oléique (18:1, « oméga-9 »), 22% (m/m) d'acide linoléique (18:2, « oméga-6 »), 9% (m/m) d'acide linolénique (18:3, « oméga-3 »), 6% (m/m) d'acide palmitique (16:0) et 5% (m/m) d'autres acides gras (Unger, 1990).

Sa production et sa commercialisation se sont développées à partir du XVI^e siècle aux Pays-Bas. Aujourd'hui, il est cultivé dans de très nombreux pays dans le monde, essentiellement dans les régions tempérées (PROLEA, 2009). En 2014, l'Union Européenne a produit près de 40 millions de tonnes d'oléagineux dont environ 24 millions de tonnes de colza, soit une augmentation de plus 17% par rapport à 2013 (Fine *et al.*, 2015; TERRES-INOVIA, 2015). En France, le colza est cultivé sur plus d'un million et demi d'hectares principalement dans le Centre, en Bourgogne, Champagne Ardennes et en Lorraine (Figure 3) (TERRES-INOVIA, 2015).

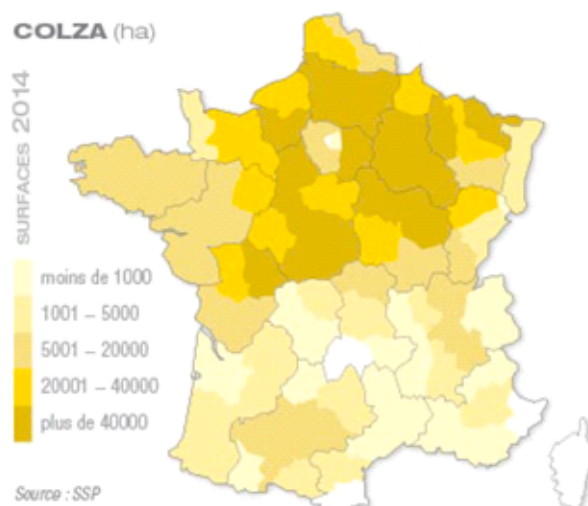


Figure 3. Distribution des cultures de colza en France. Source : Terres Inovia (2015).

Alors que certains pays comme l'Inde utilisent l'huile de colza essentiellement à des fins alimentaires, en Europe, elle est surtout destinée à la production de biocombustibles (environ 75% de la production) (Fine *et al.*, 2015; Lomascolo *et al.*, 2012).

Le processus d'extraction de l'huile des graines, de fractionnement de la plante ou de purification est réalisé dans des biorrafineries. L'un des objectifs des biorrafineries est aussi de valoriser les ressources agro-industrielles et la transformation de la biomasse afin d'obtenir des produits aux usages divers dans des biocarburants, aliments ou des produits avec de la valeur ajoutée (PROLEA, 2009). En effet, à l'ère de la chimie verte, un grand effort se réalise dans plusieurs domaines afin de minimiser l'impact environnemental de tous les types de transformation de biomasse. Le développement et la mise en œuvre de processus durables qui convertissent la biomasse en produits à valeur ajoutée est une nécessité absolue pour valoriser les coproduits agro-industriels et réduire l'impact environnemental. Les coproduits des processus d'extraction des huiles végétales de graines oléagineuses sont appelés gâteau ou tourteau.

II.2 LE GATEAU ET LE TOURTEAU DE COLZA

Le gâteau de colza obtenu après extraction mécanique (pressage) de l'huile peut représenter 50 à 58% de la masse totale de la graine (Unger, 1990). Après

déshuilage du gâteau par un solvant organique, généralement l'hexane, le matériel obtenu est nommé tourteau. La quantité d'huile résiduelle dans le tourteau dépend de la méthode d'extraction et des prétraitements des graines, elle varie généralement entre 1 et 10% (m/m) (Unger, 1990). La France et l'Allemagne sont les plus importants producteurs et consommateurs de tourteau de colza de l'Union Européenne (PROLEA, 2012-2013). En 2014, la France a produit environ 2.5 millions de tonnes de tourteau de colza (FEDIOL). La composition massique générale du tourteau de colza est représentée sur la Figure 4. Riche en fibres et en minéraux tels que le calcium, le magnésium, le zinc et le cuivre, le tourteau de colza contient également un certain nombre de vitamines et autres composés bioactifs, tels que les tocophérols et la choline. La présence de protéines brutes (35-37%), plus de 30% de glucides et 1 à 10% de résidus d'huile, en fait un aliment pour animaux de grande valeur tout à fait capable de remplacer le tourteau de soja. En effet, malgré les problématiques liées à l'utilisation d'OGM (organismes génétiquement modifiés), le tourteau de soja reste la première source de consommation mondiale de protéines végétales. Cependant, la recherche d'une autonomie protéique au niveau national, afin de réduire l'importation du tourteau de soja est un des points d'attention de la filière des oléagineux en France. Dans l'Union Européenne, le tourteau de soja a été remplacé par celui du colza pour l'alimentation bovine (lait et viande), et représente jusqu'à 6 kg par jour et par animal (CETIOM, 2011).

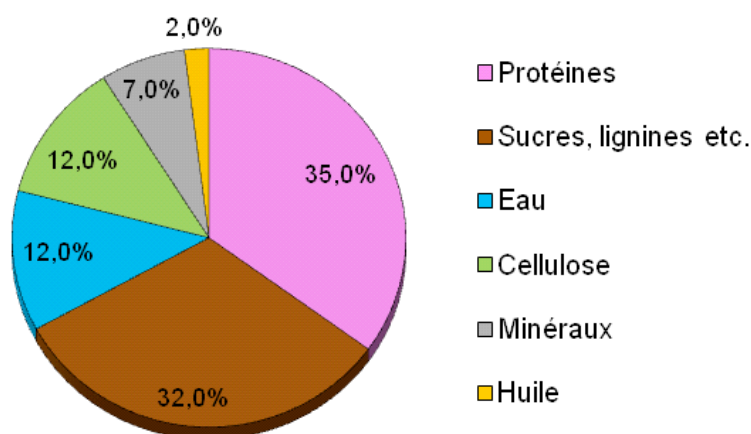


Figure 4. Composition massique chimique du tourteau de colza. Source: « Le colza, de la plante à ses produits ». (Annual Publication CETIOM, 2012; CETIOM, 2014).

Le tourteau de colza est aussi une source riche en composés phénoliques. En effet, comme en attestent certaines études (Kozłowska *et al.*, 1990; Nowak *et al.*, 1992),

c'est la plante oléagineuse avec la concentration la plus élevée en composés phénoliques. A titre d'exemple, Kozłowska *et al.* (1990) ont montré que comparé à d'autres tourteaux de plantes oléagineuses tels que le soja, le coton, l'arachide ou le tournesol dont la concentration en acides phénoliques totaux était respectivement de 1.04, 2.53, 2.84 et 16.37 micromoles d'équivalents en'acide sinapique (EAS) par gramme de matière sèche ($\mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$), celle du colza pourrait atteindre de 28.54 à 82.07 $\mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$. La concentration en composés phénoliques dans le gâteau est inférieure à celle du tourteau. En outre, les conditions de croissance et le degré de maturation affectent la composition phénolique.

Artz *et al.* (1986) ainsi que Matthaus (2002) ont montré que les composés phénoliques sont principalement localisés dans les cotylédons, alors que quelques traces se trouvent dans la coque. Au niveau cellulaire, les composés moins polaires sont présents dans les parois cellulaires, alors que les plus polaires se trouvent dans les vacuoles de la cellule végétale. De même, Fang *et al.* (2012) ont étudié la distribution de ces métabolites secondaires dans quatre parties différentes des graines matures de colza (*Brassica napus L.*) : les cotylédons internes et externes, la coque et la radicule. Ils ont observé que ces molécules étaient distribuées de façon homogène dans ces différents tissus.

Ces composés phénoliques sont retrouvés dans les tourteaux de colza. Leur concentration et leur nature dépendent fortement du type de procédé employé lors de l'extraction de l'huile. Ces traitements déterminent le comportement et la répartition de ces composés et par conséquent, leur distribution entre les fractions d'huile et de tourteau (Terpinc *et al.*, 2011).

Les faibles rendements en composés phénoliques dans le tourteau obtenu à partir du processus de pressage de graines oléagineuses peuvent être dus à la résistance des parois des cellules végétales auxquelles certains des composés phénoliques ont tendance à rester liés. Azadmard-Damirchi *et al.* (2010) ont montré que le prétraitement thermique, par micro-ondes, entraîne une modification de la paroi cellulaire en augmentant sa porosité et en facilitant l'extraction de l'huile et des composés phénoliques. Ces derniers fortement liés à la matrice peuvent alors être libérés soit par la torréfaction des graines (Chipurura *et al.*, 2010; Dai et Mumper,

2010), soit par hydrolyse alcaline ou par l'action d'enzymes spécifiques comme la feruloyl estérase (EC 3.1.1.73), la sinapine estérase (EC 3.1.1.49) etc. (Khattab *et al.*, 2014; Vuorela *et al.*, 2003).

III. LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les composés phénoliques sont omniprésents dans toutes les plantes. Leur structure chimique est basée sur la présence d'un cycle aromatique lié à un groupement hydroxyle. Etant impliqués dans diverses fonctions telles que la structure, la pigmentation, la pollinisation, la défense contre des agents pathogènes et la résistance aux herbivores, ils sont essentiels à la physiologie de la plante. Ils sont considérés comme les métabolites secondaires les plus abondants des plantes supérieures et ils présentent des structures très diverses, allant de simples molécules telles que des acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (proanthocyanidines). En général, dans les plantes oléagineuses, les principaux composés phénoliques sont des dérivés d'acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique (Figure 5), ainsi que les coumarines et les flavonoïdes (Figure 6) (Dewick, 2001).

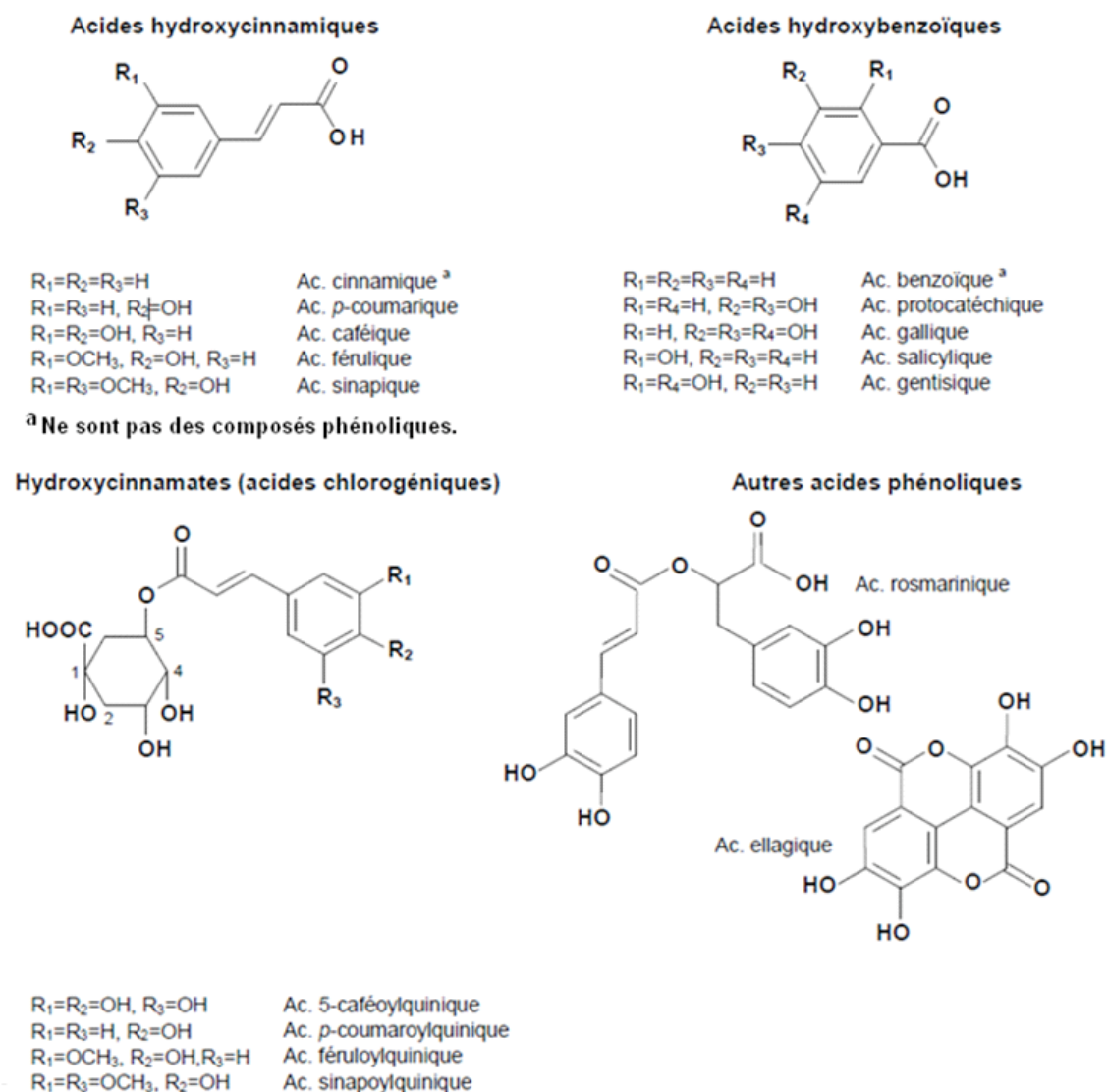


Figure 5. Structure chimique des principaux acides et esters phénoliques dans le règne végétal. Source : Laguerre (2008).

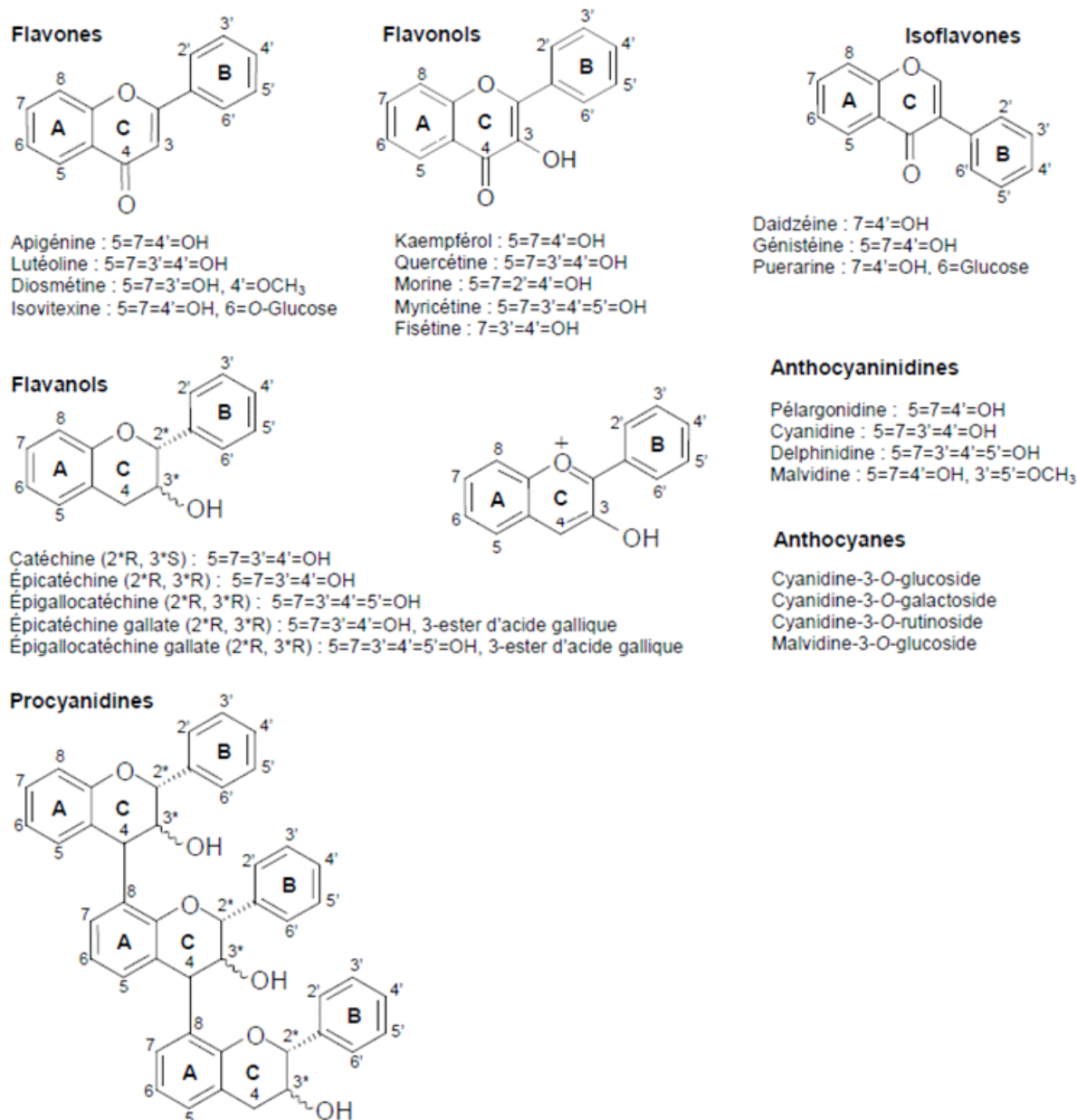


Figure 6. Structure chimique des principaux flavonoïdes du règne végétal. Source : Laguerre (2008).

III.1 EXTRACTION DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

L'extraction des composés phénoliques des matières premières végétales est réalisée à l'aide de solvants. En raison de sa facilité de mise en œuvre et son efficacité, l'extraction solide-liquide est en effet la méthode la plus répandue pour la récupération de ces composés naturels. Cette dernière est influencée par de nombreux facteurs tels que le type de solvant utilisé (polarité), le temps d'extraction,

la température, le ratio masse d'échantillon/solvant, ainsi que la composition chimique et les caractéristiques physiques des échantillons (Dai et Mumper, 2010). En général, avant l'extraction, les échantillons (graines ou tourteaux) sont broyés et/ou délipidés. En fonction du système de solvant utilisé pour l'extraction, des composés (sucres, protéines) autres que les polyphénols peuvent être conjointement extraits. En conséquence, des étapes supplémentaires (centrifugation, précipitation par changement de pH) peuvent s'avérer nécessaires pour éliminer ces composés indésirables. Les solvants employés lors de l'extraction des composés phénoliques sont en général l'eau, le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle et des combinaisons de ceux-ci. Selon les données de la littérature (Tableau 1), le méthanol est le solvant le mieux indiqué pour les composés phénoliques de faible poids moléculaire, tandis que les flavonoïdes, avec des masses moléculaires plus élevées, sont mieux extraits avec des solutions aqueuses d'acétone (Meneses *et al.*, 2013).

Une augmentation de la température d'extraction peut générer une plus grande solubilité des substances à extraire. De plus, à des températures plus élevées, la viscosité et la tension superficielle du solvant sont réduites, ce qui favorise son accessibilité au sein des matrices végétales. Cependant, les composés phénoliques étant facilement oxydables, de longues périodes d'extraction et/ou d'exposition à des températures élevées favorisent leur oxydation ; c'est pourquoi, il est important d'obtenir le meilleur rapport solvant/température/temps d'extraction pour maximiser à la fois le rendement du procédé mais aussi de maintenir la stabilité des composés à extraire. Par exemple, Cai et Arntfield (2001) ont testé différentes procédures pour l'extraction des composés phénoliques des graines et des tourteaux de colza et ont montré que le meilleur rendement en composés phénoliques (102.14 μmol EAS de composés phénoliques totaux par gramme de farine) était obtenu lorsque l'extraction s'opérait avec une solution méthanol/eau (70/30, v/v) à 75°C pendant 20 minutes. Cette méthodologie a été adoptée dans diverses études impliquant les composés phénoliques du colza, comme dans celles rapportées par Spielmeyer *et al.* (2009), Vuorela *et al.* (2004) et Khattab *et al.* (2014).

Tableau 1. Exemples de méthodes d'extraction des composés phénoliques provenant de différentes sources végétales décrites dans la littérature.

Auteur	Matière première	Solvant dans l'eau	T (°C)	Temps	TPC ^a (μmol EAS.g ⁻¹)
(Joya Jorge <i>et al.</i> , 2013)	Peaux de cactus	Éthanol (35%, v/v)	93	4 h	2038
(Cai et Arntfield, 2001)	Tourteau de colza	Méthanol (70%, v/v)	75	2 x 20 min	102
(Meneses <i>et al.</i> , 2013)	Drêches de malt	Acétone (60%, v/v)	80	30 min	44
(Spielmeyer <i>et al.</i> , 2009)	Grains de colza	Méthanol (70%, v/v)	75	20 min	nc ^b
(Suarez <i>et al.</i> , 2009)	Grignons d'olive	Éthanol (80%, v/v) Haute pression (ASE100 - Dionex)	80	2 x 5 min	nc
(Szydłowska-Czerniak <i>et al.</i> , 2014)	Tourteau de colza	Méthanol (50%, v/v)	25	3 x 1 h	nc
(Terpinc <i>et al.</i> , 2012)	Tourteau de cameline	Méthanol (80%, v/v)	25	8 h	7430
(Thiyam <i>et al.</i> , 2006)	Tourteau de colza	Méthanol (70%, v/v) + Ultrason	25	3 x 50 s	nc
(Wakamatsu <i>et al.</i> , 2005)	Huile de colza	Méthanol (pur)	25	3 x 10 min	nc
(Kozłowska <i>et al.</i> , 1983)	Farine de colza	Méthanol (80%, v/v)	nc	nc	53 - 321
(Wanasundara <i>et al.</i> , 1994)	Tourteau de colza	Éthanol (95%, v/v)	80	2 x 20 min	98 - 865
(Amarowicz et Shahidi, 1994)	Tourteau de colza	Éthanol (95%, v/v)	80	2 x 20 min	nc

^aTPC : Teneur en composés phénoliques totaux (*Total Phenolic Content*).^bnc : non cité.

Outre les méthodes classiques d'extraction (Soxhlet), ils existent des méthodes qui utilisent les micro-ondes, les ultrasons ou les fluides supercritiques (Cavero *et al.*, 2006; de Lucas *et al.*, 2002; Gelmez *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2013; Naczki et Shahidi, 2004). Enfin, il est important de souligner que les traitements thermiques peuvent contribuer à transformer les composés natifs en d'autres molécules avec des propriétés différentes. Par exemple, les acides hydroxycinnamiques, majoritairement présents dans les plantes oléagineuses, peuvent être transformés en leurs dérivés alcéniques par décarboxylation (Spielmeyer *et al.*, 2009; Walter Fiddler, 1967).

III.2 APPLICATIONS DES COMPOSES PHENOLIQUES NATURELS

On retrouve les composés phénoliques naturels dans une large gamme d'applications. Ils sont utilisés comme conservateurs d'aliments (Shahidi et Zhong, 2010) ; ils entrent dans la formulation d'arômes, de cosmétiques (Bogdan Allemann et Baumann, 2008) ; et tout récemment, ils ont été employés dans la synthèse de polymères (Nouailhas *et al.*, 2010). Ils sont essentiellement connus pour leurs propriétés antioxydante (Shahidi, 2000; Shahidi et Ambigaipalan, 2015), antimicrobienne (Suriyarak *et al.*, 2014), antivirale (Ikken *et al.*, 1999), anticarcinogène (Maeda *et al.*, 2006; Sawa *et al.*, 1999) et pour leur capacité à filtrer les rayons UV (Edreva, 2005). Leur activité antioxydante se traduit par leur aptitude à piéger les radicaux libres et ainsi, à lutter contre le stress oxydant qui correspond à un excès d'espèces oxydantes (espèces réactives de l'oxygène, EROs) dans le milieu intracellulaire. Selon Sies (1985), le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre ces oxydants et les antioxydants, ce qui peut entraîner des dommages à l'organisme. Ainsi, les EROs et leur implication probable dans certaines physiopathologies humaines suscitent, depuis ces dernières décennies, un intérêt grandissant dans le domaine de la santé. Harman (1956) a émis l'hypothèse que le vieillissement serait en partie dû à une accumulation de dommages moléculaires et cellulaires provoqués par les EROs. Le stress oxydant, semble être lié au développement de nombreuses maladies telles que cancers (Kawanishi *et al.*, 2002; Lichtenberg et Pinchuk, 2015), maladies cardio-vasculaires (Sachidanandam *et al.*, 2005) et inflammations (Bodamyali *et al.*, 2000). Les mécanismes par lesquels ces pathologies se développent impliquent généralement l'altération oxydative de molécules d'importance physiologique comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques, ainsi que la modulation de l'expression des gènes et de la réponse inflammatoire. Mateos *et al.* (2005) ont signalé que la cytotoxicité et la peroxydation lipidique sont associées au vieillissement cellulaire et aux maladies chroniques. Différents moyens de prévention sont disponibles pour limiter ces phénomènes. Parmi eux, figure l'emploi d'antioxydants, tels que les composés phénoliques naturels.

Dans le secteur de l'industrie, l'oxydation constitue probablement l'un des paramètres majeurs à l'origine de l'altération des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des produits et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. Là encore, l'introduction d'antioxydants naturels peut s'avérer très profitable.

Outre l'activité antioxydante, la structure chimique des composés phénoliques peut être exploitée pour d'autres types d'applications. En effet, ces dernières années ont connu une demande croissante en termes de polymères issus de ressources renouvelables afin de substituer l'utilisation des polymères issus de dérivés pétroliers. A titre d'exemple, une attention particulière a été accordée au développement de résines époxy à partir de dérivés d'huiles végétales.

Les propriétés et les performances des résines époxy sont très dépendantes de leur architecture moléculaire. Si les structures chimiques des résines époxy sont constituées de chaînes aliphatiques ou flexibles, leur résistance thermique est inférieure à celles contenant des cycles aromatiques et/ou des hétérocycliques. Par conséquent, la fonctionnalisation de molécules phénoliques naturelles peut être une alternative séduisante pour créer des matériaux correspondant aux besoins des applications auxquelles ils sont destinés.

III.3 COMPOSES PHENOLIQUES DU COLZA : NATURE ET PROPRIETES

En fonction de la variété de plante et du procédé d'extraction mis en œuvre, la teneur totale en composés phénoliques dans le tourteau de colza peut varier de 27 à 80 $\mu\text{mol EAS.g}^{-1}$, (Kozłowska *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 2012). Seule une petite fraction des acides phénoliques existe sous forme libre, la plupart se retrouve soit sous forme d'ester, d'éther ou d'acétal, soit lié à des composants structurels de la plante (sucres, kaempferols), protéines ou hydrates de carbone.

Naczka *et al.* (1998) ont classé les composés phénoliques du colza en deux principales catégories:

- i) les tannins condensés ou proanthocyanidines plus ou moins polymérisés qui à l'évidence comptent pour la plus forte concentration en composés phénoliques dans la coque de la graine.
- ii) les acides phénoliques libres (peu concentrés et correspondant surtout à l'acide sinapique) et les acides phénoliques estérifiés, notamment la classe des sinapines.

III.3.1 La Sinapine

La sinapoylcholine ou sinapine (2-[[3-(4-Hydroxy-3,5-diméthoxyphényl)acryloyl]oxy]-*N,N,N*-triméthylethanaminium), ester de choline de l'acide sinapique (acide 3-(4-hydro-3,5-diméthoxyphényl)-prop-2-énoïque), est le composé phénolique majoritaire du colza, constituant jusqu'à 80% de la totalité des composés phénoliques présents (Kozłowska *et al.*, 1990) et responsable du goût amer et de la coloration marron des tourteaux. Au cours des premières étapes du développement des semis, la sinapine est convertie en sinapoylmalate, cette molécule protège les feuilles contre l'irradiation UV-B et est impliqué dans la défense contre les champignons. Au cours de la germination, la sinapine est hydrolysée en choline et en acide sinapique (Figure 7), ce dernier peut intervenir comme précurseur pour la biosynthèse d'autres composés phénoliques, tels que la lignine (Fang *et al.*, 2012; Iwanowska *et al.*, 1994; Naczek *et al.*, 1998; Tzagoloff, 1963). Thyiam *et al.* (2006) ont rapporté que l'acide sinapique libre constitue de 6 à 14% de la totalité de composés phénoliques présents dans le tourteau de colza.

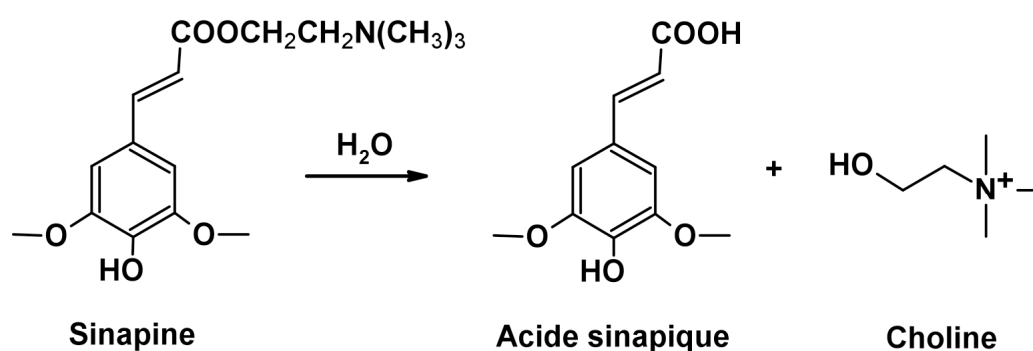


Figure 7. Hydrolyse de la sinapine en acide sinapique.

III.3.2 L'acide sinapique

L'acide sinapique [acide 3-(4-hydro-3,5-diméthoxyphenyl)-prop-2-énoïque] appartient au groupe des acides hydroxycinnamiques. Il est formé d'un cycle aromatique avec un groupement hydroxyle en position 4, ainsi que de deux groupements méthoxy en positions 3 et 5 (Figure 7). Il représente environ 80% des acides phénoliques présents dans le tourteau (Naczek *et al.*, 1998). Très peu soluble dans l'huile, il reste dans le tourteau après le pressage des graines. Seule une petite partie de l'acide sinapique présent dans la graine, moins de 16% est présente sous forme d'acide sinapique libre (Kozłowska *et al.*, 1990). Typiquement, la quantité d'acide sinapique dans le tourteau peut varier entre 28 et 82 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, selon la variété de la plante oléagineuse et la méthode d'extraction de l'huile (Amarowicz et Shahidi, 1994; Unger, 1990).

III.3.3 Le Canolol

En 2003, Koski et son équipe (Koski *et al.*, 2003) ont mis en évidence la formation d'un dérivé phénolique au cours du processus d'extraction de l'huile de colza, sous haute pression et haute température. Ils ont montré que cette molécule, nommée canolol (2,6-diméthoxy-4-vinylphénol, Figure 8), était le composé phénolique prédominant dans l'huile brute de colza, représentant jusqu'à 85% des composés phénoliques totaux (Koski *et al.*, 2003). D'autre part, ces mêmes auteurs ont rapporté que la stabilité de l'huile à l'auto-oxydation augmentait en présence de canolol et que celui-ci présentait la meilleure activité antioxydante parmi tous les composés de la fraction polaire extraite de l'huile brute. Un an plus tard, Kuwahara *et al.* (2004) ont confirmé la grande efficacité du canolol comme piègeur de radicaux libres ainsi que son activité antimutagène contre l'action des bactéries du genre *Salmonella*.

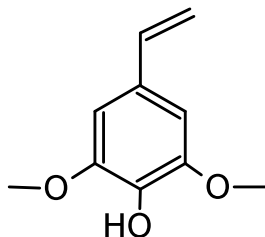


Figure 8. Structure chimique du canolol (2,6-diméthoxy-4-vinylphénol).

Le canolol appartient à la famille des vinylphénols, ces derniers sont formés au cours des traitements thermiques ou enzymatiques que subissent les acides hydroxycinnamiques correspondants. Certains de ces composés et leurs dérivés sont employés dans l'industrie comme arômes naturels, dans la parfumerie ou l'agroalimentaire. Les dérivés 4-vinyls sont à l'origine de l'arôme fumé des produits de charcuterie (Guillen et Ibargoitia, 1998). Outre leurs propriétés aromatisantes, ces dérivés sont employés comme stabilisateurs de pigments de jus de fruits et de vins rouges (Dewick, 2001).

III.3.3.1 Formation du canolol

Le canolol est normalement extrait des fractions polaires des tourteaux de colza. Il peut être obtenu à partir de l'hydrolyse de la sinapine en acide sinapique, suivie par la décarboxylation thermique de ce dernier via la réaction de Maillard (Figure 9) (Shrestha et De Meulenaer, 2014).

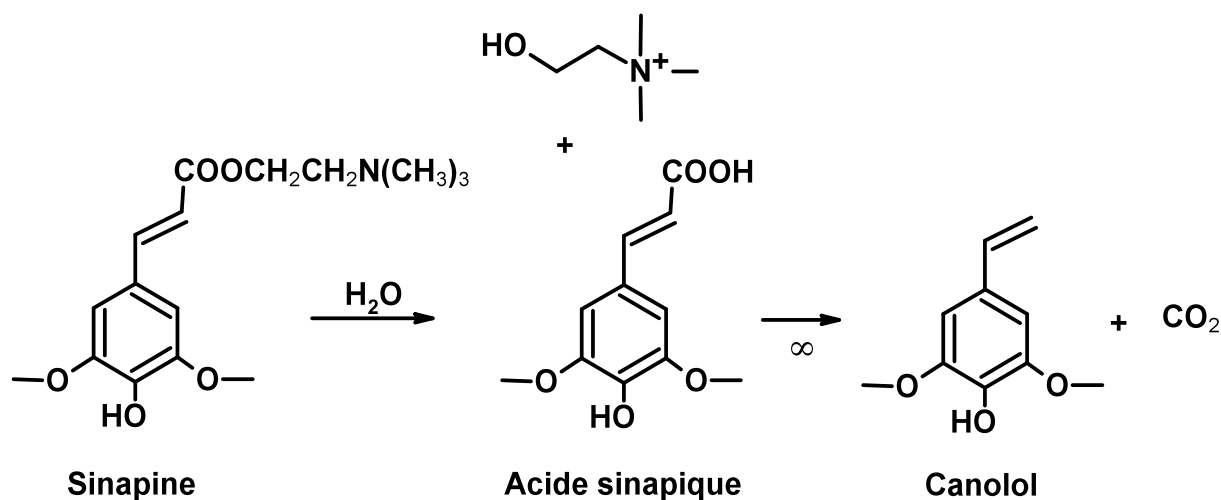


Figure 9. Réaction d'hydrolyse de la sinapine en acide sinapique, puis décarboxylation de ce dernier en canolol.

En partie responsable de la décarboxylation, la température est un facteur important dans la formation du canolol au sein des tourteaux de colza.

La torréfaction des graines de colza avant le pressage peut conduire à une augmentation de la teneur en canolol dans l'huile (Spielmeyer *et al.*, 2009). Pour augmenter cette teneur, différents prétraitements des graines ont été

proposés comme la torréfaction au four micro-ondes, au four conventionnel ou en bain d'huile. Par exemple, la torréfaction des graines de colza au four conventionnel (165°C, 5 minutes) a nettement augmenté leur teneur en canolol dans l'huile jusqu'à 17 à 100 fois comme cela a été respectivement observé dans les travaux de Wijesundera *et al.* (2008) et Wakamatsu *et al.* (2005). Zacchi et Eggers (2008) ont traité les graines de colza dans un autoclave à 145°C pendant 5 minutes, et ont montré que l'huile brute extraite contenait 10 fois plus de canolol que celle issue des graines non torréfiées. En 2012, l'équipe de Shrestha (Shrestha *et al.*, 2012) a testé la torréfaction des graines dans un bain d'huile à 180°C pendant 10 minutes et a démontré que la teneur en canolol dans l'huile extraite augmentait d'un facteur 100. En conservant la même température de chauffage que celle employée par Wakamatsu *et al.* (2005) et Wijesundera *et al.* (2008), Pudiel *et al.* (2014) ont testé la torréfaction, par air chaud, directement sur le tourteau dans un lit fluidisé à 165°C ; Ils ont obtenu un rendement en canolol de l'ordre de 2778 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$ de tourteau.

En ce qui concerne la torréfaction des graines assistée par les micro-ondes (2.45 GHz, 800W), Spielmeyer *et al.* (2009) ont examiné différents intervalles de temps de torréfaction ; leur meilleur résultat (augmentation de 120 fois en teneur de canolol) correspondait à un temps total de torréfaction, de 7.5 minutes, avec 5 intervalles de 1.5 minutes chacun (160°C). Par ailleurs, ces auteurs ont montré que la température de chauffage influait d'avantage sur la quantité du canolol formé plus que la méthode de torréfaction. Niu *et al.* (2013) et Yang *et al.* (2014) ont testé une torréfaction pendant 7 minutes en continu, et ont rapporté une augmentation des teneurs en canolol de 6 fois par rapport aux graines non torréfiées. Khattab *et al.* (2014) ont torréfié les graines pendant 13 minutes (puissance 3, 300W) et ont observé que 58% d'acide sinapique se convertissait en canolol.

III.3.3.2 Le canolol dans l'huile de colza

La distribution des composés phénoliques pendant les traitements des graines est un facteur important à considérer. Ainsi Yang *et al.* (2014) et Zheng *et al.* (2014) ont démontré que le taux de transfert du canolol de la graine à l'huile brute était proportionnel au temps d'exposition aux micro-ondes.

Thiyam-Hollaender *et al.* (2014) ont évalué l'impact des processus de pressage et de broyage des graines de moutarde et de colza sur le passage du canolol dans l'huile. A l'issu de cette étude, des traces de canolol ont été détectées pour la première fois dans des échantillons d'huile commerciale qui n'ont pas subi de prétraitements thermiques. Il est possible que la chaleur générée pendant les étapes de pressage et/ou de broyage ait induit la conversion de l'acide sinapique en canolol. Néanmoins, au cours du processus de raffinage de l'huile, une diminution drastique de la quantité de composés phénoliques est généralement observée. De ce fait, même si la majorité du canolol formé pendant les prétraitements des graines, a été transféré à l'huile, ses teneurs deviennent presque indétectables à la fin du raffinage (Koski *et al.*, 2003; Kraljic *et al.*, 2015). Harbaum-Piayda *et al.* (2010) ont suggéré qu'en raison de sa grande réactivité, le canolol présent dans l'huile de colza pouvait donner lieu à de nouveaux dérivés phénoliques au cours du raffinage, tels que des dimères et des oligomères.

III.3.3.3 Propriétés chimiques et biologiques

De nombreuses propriétés biologiques sont attribuées au canolol, parmi elles, figure en premier lieu, l'activité antioxydante qui lui confère des propriétés anti-cancérogène et antimutagène (Cao *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2013).

III.3.3.3.1 Activité antioxydante

La réactivité du canolol par rapport aux radicaux $\bullet\text{OOH}$ a lieu presque exclusivement par le transfert de l'atome d'hydrogène phénolique du canolol, quelle que soit la polarité de l'environnement (Galano *et al.*, 2011).

Wang *et al.* (2014) ont comparé le canolol à l'acide sinapique dans la protection de l'huile de soja et ont montré que le canolol exhibait une activité antioxydante plus importante que celle de l'acide sinapique. De même, les activités antioxydantes de l'acide sinapique et du canolol ont été évaluées par la méthode DPPH (Harbaum-Piayda *et al.*, 2010; Terpinic *et al.*, 2011; Vuorela, 2005; Vuorela *et al.*, 2004). Dans le milieu polaire employé pour la méthode DPPH, l'acide sinapique s'est avéré être un

meilleur piègeur de radicaux libres que le canolol. De même, Terpin *et al.* (2011) ont rapporté que, dans l'essai de pouvoir réducteur ferrique (FRAP, en anglais : *Ferric ion reducing antioxidant power*) (vérification du potentiel antioxydant grâce à la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) dans milieu acide), le canolol était 50% moins efficace que l'acide sinapique. Cependant, dans des milieux émulsionnés, le canolol a montré une activité antioxydante légèrement plus élevée que celle de l'acide sinapique (Koski *et al.*, 2003; Vuorela, 2005).

Par ailleurs, Kuwahara *et al.* (2004) ont révélé que le canolol pouvait contribuer à protéger les lipides et les protéines de l'oxydation et ont constaté que son activité était supérieure à celle de certains flavonoïdes ou de l' α -tocophérol. Selon les mêmes auteurs, des quantités égales ou supérieures à $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de canolol pourraient empêcher l'action des agents oxydants mutagènes tels que les peroxynitrites (ONOO^-) produits par des leucocytes inflammatoires, la mutation bactérienne et aussi l'apoptose cellulaire induite par le stress oxydant. Le caractère lipophile du canolol pourrait expliquer son affinité pour les membranes cellulaires et d'autres membranes biologiques et, donc, sa réactivité dans les cellules (Khattab *et al.*, 2014).

L'activité antioxydante du canolol contre l'action du virus *H. pylori* (responsable de la gastrite et de la carcinogénèse) dans un système modèle animal a été étudiée par Cao *et al.* (2015; 2008; 2012). L'infection causée par le *H. pylori* peut conduire les cellules infectées à produire des Espèces réactives de l'oxygène, EROs, qui peuvent causer l'oxydation des lipides, des protéines et aussi de l'ADN. En présence de canolol, les EROs sont piégées et leur action oxydative est inhibée. En outre, les expérimentations réalisées au cours de cette étude ont indiqué que le canolol n'avait aucune cytotoxicité contre les cellules saines. Ces résultats suggèrent que le canolol pouvait être éventuellement considéré comme nouvel agent anti-carcinome gastrique naturel. Dans le même registre, les travaux de Jiang *et al.* (2013) ont démontré que le canolol était capable de prévenir la prolifération de cellules cancéreuses du système gastrique humain. En effet, pour une concentration de $1.2 \mu\text{mol.L}^{-1}$, le canolol a provoqué l'apoptose de ces cellules *in vitro*.

Toutefois, l'activité antioxydante du canolol ne devrait pas constituer le seul outil à exploiter pour valoriser cette molécule. Le canolol est un composé phénolique avec une structure chimique assez particulière. En effet, la présence de nombreux groupements fonctionnels, comme le groupement hydroxyle phénolique, le cycle benzénique riche en électrons ainsi que la α,β -double liaison insaturée, ouvre la voie vers de multiples possibilités de modifications chimiques de ce composé. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à l'utilisation du canolol pour la synthèse de précurseurs de polymères et d'autres composés chimiques.

IV. REACTIONS DE FONCTIONNALISATION DES COMPOSES PHENOLIQUES

IV.1 AMELIORATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE PAR REACTIONS DE LIPOPHILISATION

Comme cela a été mentionné précédemment, les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant pour leurs propriétés antioxydantes. Cependant, la mise en œuvre de ces molécules polaires dans des matrices lipidiques ou des formulations de type émulsion est délicate et peut s'accompagner d'une diminution de leur efficacité à protéger les lipides contre l'oxydation. L'une des stratégies visant à améliorer cette efficacité consiste à diminuer considérablement la polarité de ces molécules par le greffage de chaînes aliphatiques grasses, afin d'ajuster leur balance hydrophyle/lipophile. Le résultat attendu est une facilité d'incorporation accrue dans les formulations alimentaires et cosmétiques ainsi qu'une amélioration significative de leur action antioxydante.

En effet, dans une microémulsion d'huile de tung purifiée stabilisée avec du Brij 35 (émulsifiant non ionique) [méthode CAT développée dans notre laboratoire (Laguerre *et al.*, 2008)], il a été observé que l'activité antioxydante de chlorogénates d'alkyle synthétiques augmentait proportionnellement à la longueur de chaîne alkyle greffée jusqu'au motif dodécyle en C12:0, seuil au-delà duquel toute élongation de la chaîne

s'accompagnait d'une chute drastique d'activité (Laguerre *et al.*, 2009a). Cet effet non-linéaire de l'hydrophobie a été appelé « effet *cut-off* » en référence au terme déjà employé depuis les années 30 en biologie et en microbiologie pour qualifier un tel comportement dans d'autres activités que l'activité antioxydante. D'après Balgavy et Devinsky (1996), l'effet *cut-off* serait un phénomène général observé pratiquement à chaque fois qu'une famille d'homologues structuraux variant dans la longueur de la chaîne carbonée était étudiée.

Dans le même système micro-émulsifié et en utilisant l'acide rosmarinique et ses esters alkylés de synthèse (méthyle, butyle, octyle, dodécyle, hexadécyle, octadécyle et eicosyle), un effet *cut-off* encore plus prononcé qu'avec les chlorogénates, a été observé (Laguerre *et al.*, 2010). En effet, la relation entre la longueur de la chaîne alkyle et l'activité antioxydante suivait une allure quasi-parabolique avec une chaîne critique (valeur optimale) en C8:0. Cet effet non-linéaire a par la suite été confirmé dans une émulsion (macro-émulsion) d'huile de soja purifiée avec les mêmes rosmarinates d'alkyle (Panya *et al.*, 2012). Les données ont montré que l'acide rosmarinique et ses esters octadécylique (C18:0) et eicosylique (C20:0) étaient de piètres antioxydants comparés aux esters à courte-moyenne chaîne comme le butyle, l'octyle et le dodécyle. À l'heure actuelle, des données confirmant l'occurrence d'un effet *cut-off* dans les émulsions sont régulièrement publiées dans la littérature avec des molécules de synthèse. Les composés les plus cités sont les rosmarinates d'alkyle (Lee *et al.*, 2013), les esters alkylés d'hydroxytyrosol (Medina *et al.*, 2009), les esters alkylés de rutine (Sorensen *et al.*, 2012), les cafféates, les coumarates et les férulates d'alkyle (Sorensen *et al.*, 2014), les gallates d'alkyle (Losada Barreiro *et al.*, 2013), ainsi que les protocatéchuates d'alkyle (Grajeda-Iglesias *et al.*, 2015).

Si de nombreux composés phénoliques ont été lipophilisés (Kahveci *et al.*, 2015), à ce jour, il n'existe en revanche aucune donnée concernant les vinylphénols, comme le canolol. La lipophilisation de ces composés donnerait accès à de nouvelles molécules actives multifonctionnelles dont les propriétés antioxydantes peuvent être améliorées en raison de la chaîne aliphatique greffée à la molécule phénolique. La lipophilisation des vinylphénols sera abordée dans la section III.1 du chapitre 3 de ce manuscrit.

IV.2 FORMATION DE PRECURSEURS DE BIOPOLYMERES

L'accès à des sources renouvelables en composés phénoliques a été récemment discuté par Mialon *et al.* (2010), qui ont étudié la préparation d'analogues de PET [poly(éthylène téréphtalate)] à partir des sous-produits de l'industrie des pâtes à papiers riche en vanilline et en acide férulique. Fache *et al.* (Fache *et al.*, 2015a; Fache *et al.*, 2015b) et Imre & Pukánszky (2015) ont récemment publié des travaux portant sur la synthèse de biomatériaux polymériques époxy à partir de la vanilline. Produits à partir des aldéhydes naturels comme la vanilline et le syringaldéhyde, les dérivés phénoliques vinyliques pourraient avantageusement remplacer certains dérivés phénoliques synthétiques d'origine fossile dont l'innocuité est fortement remise en question (parabènes) ou dont la toxicité est parfaitement documentée tel que le bisphénol-A. En effet, grâce à leurs structures chimiques et notamment la présence de groupement alcénique sur leur cycle aromatique, ces composés constituent des molécules plateformes potentielles pour la synthèse de précurseurs de polymères. Dans ce contexte, le canolol, s'avère être une molécule de choix pour des transformations structurales visant au développement de nouveaux matériaux époxy avec des propriétés similaires à celles du bisphénol-A (BPA) et de son dérivé diglycidylé.

IV.2.1 Le bisphénol-A (BPA)

Le bisphénol-A (BPA) (4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane) (Figure 10) est un des composés chimiques le plus produits au monde en termes de volume. Sa production mondiale annuelle représentent 500 grammes par habitant, soit plus de 3 millions de tonnes (Planetoscope.com).

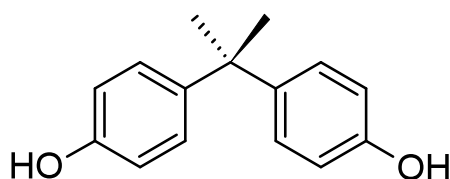


Figure 10. Structure chimique de la molécule de bisphénol-A [2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane].

Les risques sanitaires potentiels liés au BPA comprennent, entre autres, divers types de cancer (cerveau, prostate et autres), la diminution de la fertilité, la puberté précoce, les perturbations du développement fœtal, ainsi que des problèmes de reproduction féminins et même l'interférence sur le ratio de naissances hommes/femmes (Bae *et al.*, 2015; Borrell, 2010; Chen *et al.*, 2015; Hengstler *et al.*, 2011). Les préoccupations entourant le BPA ont commencé au début des années 1990, lorsque des chercheurs de l'Université de Stanford ont montré que ce composé pouvait migrer des bouteilles en plastique vers l'eau (Krishnan *et al.*, 1993). De nos jours, l'exposition au bisphénol-A est pratiquement universelle. En effet, dans une étude récente, le BPA a été détecté dans les échantillons d'urine de 92,6% de la population américaine (Castro *et al.*, 2013; Rubin et Soto, 2009). Par conséquent, avec l'objectif de répondre aux préoccupations sociétales et en raison de la pression de certains médias, des pays tels que le Canada, la France et quelques états des Etats-Unis ont décidé d'interdire l'utilisation du BPA dans les biberons et prévoient d'étendre cette interdiction à tous les contenants alimentaires (Audran, 2013; Lofstedt, 2013). L'autorité européenne de sécurité alimentaire, l'EFSA (*European Food Safety Authority*) a publié, en janvier 2015, les réglementations européennes régissant l'utilisation du bisphénol-A dans des processus de fabrication d'emballages alimentaires. Selon ses normes, l'exposition journalière tolérable (DJT) ne doit excéder 4 microgrammes de BPA par kilogramme de poids corporel par jour ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ de pc.jour⁻¹). Cette valeur de DJT n'est pas définitivement établie car une étude sur l'exposition prénatale et postnatale au BPA chez les rats est en cours (EFSA, 2015). Malgré les problèmes inhérents au BPA, ses excellentes propriétés qui lui ont permis de devenir un composant clé dans la production de nombreux composés polymères et non polymères ne peuvent pas être négligées. En effet, le BPA est un diol aromatique qui offre d'excellentes propriétés thermiques, mécaniques, optiques et électriques, en particulier lors de son incorporation dans les polymères (O dian, 2004; Ueda, 2004). Ainsi, ce produit chimique est utilisé principalement pour la production de résines de polycarbonate (71%), de résines époxy (27%), de polyesters insaturés, de polysulfones, de polyétherimides et de résines de polyarylate (Nelson et Long, 2012; Ritter et Bryson, 2011).

IV.2.2 Les résines époxy

Depuis leur création, dans les années 50, les résines époxy sont devenues l'un des grands succès de l'industrie des matières plastiques (Nouailhas *et al.*, 2010). Elles sont d'application universelle grâce à leur polyvalence et leur facilité d'utilisation. Les résines époxy englobent une grande variété de matériaux possédant une gamme étendue de propriétés physiques. Aujourd'hui, plus de 75% de résines époxy dérivent de la réaction d'un durcisseur avec l'éther diglycidylique de bisphénol-A (DGEBA), qui lui-même est préparé par le couplage d'épichlorhydrine et de bisphénol-A (BPA) (Aouf *et al.*, 2012) (Figure 11).

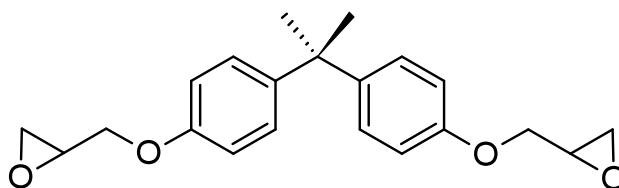


Figure 11. Structure chimique de la molécule de DGEBA {2-[[4-[2-[4-(oxiran-2-ylmethoxy)phényl]propan-2-yl]phenoxy]méthyl]oxirane}.

Ces résines se retrouvent dans de nombreuses applications comme le revêtement de surfaces métalliques, l'encapsulation électronique et isolation électrique, la fabrication d'emballages pour la conservation des aliments etc. Les résines époxy ont une excellente résistance chimique, ainsi que des caractéristiques d'adhérence et des propriétés électriques (Nouailhas *et al.*, 2011).

Compte tenu de la polémique autour du BPA et le risque de le retrouver encore dans les résines époxy après formulation (une certaine quantité qui ne soit pas emprisonnée dans le réseau formé par le DGEBA et le durcisseur), il devient important et urgent de trouver des alternatives sans danger pour l'homme et l'environnement tout en conservant les propriétés conférées par la structure chimique du BPA.

L'une de ces alternatives consisterait à utiliser des composés phénoliques naturels pour synthétiser le précurseur époxy (Harvey *et al.*, 2015).

Pour accéder à des dimères phénoliques glycidylés pouvant avoir une structure chimique proche de celle du DGEBA, nous avons opté pour la fonctionnalisation du canolol, mais nous avons voulu également étudier la réactivité d'autres homologues tels que le 4-vinylguaiacol et l'eugénol (nous justifions ce choix dans la partie résultats et discussion).

Pour la fonctionnalisation de ces composés, nous avons adopté deux stratégies différentes : i) la première consistait à exploiter la présence des doubles liaisons portées par les composés phénoliques cités ci-dessus pour étudier leur dimérisation par métathèse ; ii) la seconde stratégie est basée sur une dimérisation par O-alkylation de l'eugénol suivie de l'époxydation des doubles liaisons allyliques.

Les sections qui suivent seront consacrées à une description succincte des différentes réactions employées.

IV.2.2.1 Première stratégie : réaction de métathèse

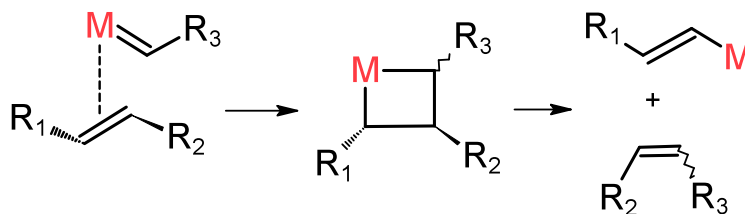
IV.2.2.1.1 Généralités sur la métathèse

L'étymologie du mot métathèse vient du grec *metayesis* qui signifie transposition ou changement de place. Cette réaction, généralement réversible, consiste en une redistribution de la chaîne carbonée catalysée par un métal de transition dans lequel un échange mutuel de liaisons carbone-carbone insaturés a lieu.

En 1997, Grubbs et son équipe de recherche ont proposé deux mécanismes pour la métathèse : un dit « associatif » et le second dit « dissociatif » (Dias *et al.*, 1997). Il a été conclu dans cette étude que la voie « dissociative » était le comportement de réaction prédominant (>95%). Il est maintenant accepté que les réactions de métathèse se produisent via la formation d'intermédiaires alkylidènes métalliques et du metallacyclobutane (Amigues *et al.*, 1991). Le mécanisme de « dissociation » suppose que lors de la liaison du métal du catalyseur avec l'oléfine, une phosphine est déplacée du centre métallique du catalyseur laissant une charge négative, et comme dans une réaction d'addition de Wittig, cette charge négative attaque l'oléfine

pour former un produit cyclique à quatre chaînons (le metallacyclobutane). Les oléfines *cis* se lient aux carbènes et les *trans* aux chlores du catalyseur avec la formation de métallacycles (étape déterminante de la vitesse de la réaction) (Figure 12).

Initiation



Cycle catalytique

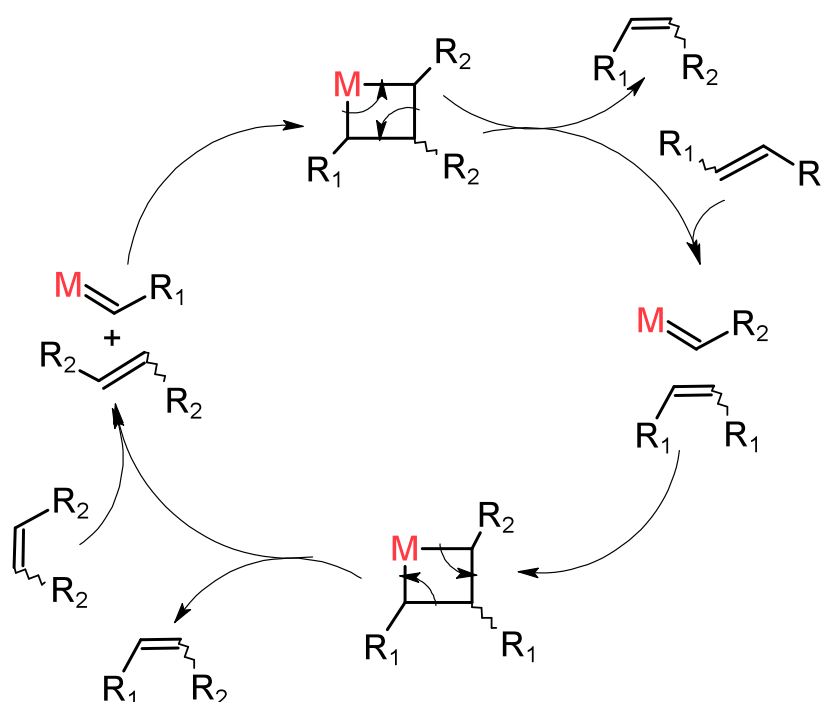


Figure 12. Représentation du mécanisme général de métathèse proposé par Chauvin et validé par Schrock et Grubbs (Grubbs *et al.*, 1975).

Le nouvel alkylidène métallique contient le métal avec ses ligands et un groupe alkylidène de l'oléfine de départ. Cet alkylidène métallique réagit avec une nouvelle molécule d'oléfine pour donner un autre metalocyclobutane intermédiaire. Lors de la décomposition dans le sens des produits, cet intermédiaire produit l'oléfine et l'alkylidène métallique. Ce dernier peut alors entrer dans un nouveau cycle catalytique. Ainsi, chaque étape dans le cycle catalytique implique l'échange d'alkylidènes, soit la métathèse. Il faut, toutefois, souligner que la nature de l'oléfine

ainsi que le métal de transition et les ligands utilisés dans le catalyseur influent sur la stéréosélectivité de la réaction de métathèse.

En 1990, le « catalyseur de Schrock » dans lequel le molybdène était le métal de transition (Schrock, 1990) s'est révélé très efficace pour catalyser la métathèse d'oléfines même peu réactives. Malheureusement, ce dernier restait difficile à utiliser à cause de sa sensibilité à l'air et à l'eau et de son intolérance pour certains groupements fonctionnels tels que les alcools ou les aldéhydes. En 1996, l'équipe de Grubbs (Schwab *et al.*, 1996) a décrit le « catalyseur de Grubbs de première génération » constitué par un alkylidène-ruthénium. Contrairement au précédent, ce catalyseur s'est avéré stable face à l'air et à l'humidité tout en catalysant la métathèse de nombreuses oléfines dans des conditions douces. Le « catalyseur de Grubbs de deuxième génération » (Vougioukalakis et Grubbs, 2010) s'est montré encore plus performant : dans ce cas-là, l'une des phosphines du complexe initial a été remplacée par un carbène *N*-hétérocyclique moins labile et capable de mieux stabiliser les espèces réactionnelles grâce à son caractère sigma donneur accru (Figure 13).

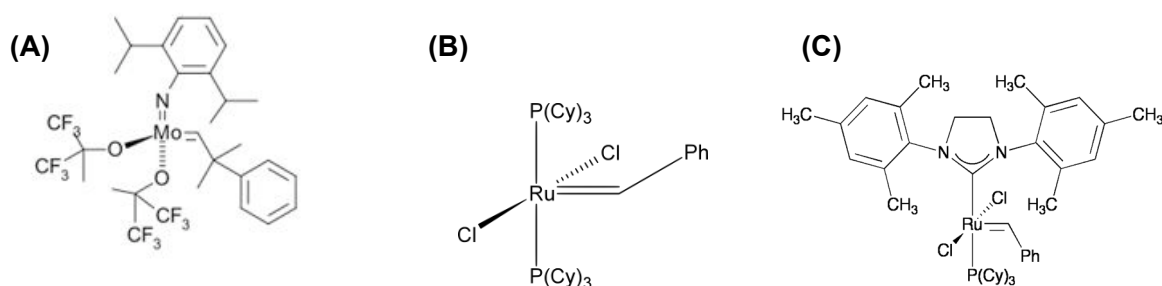


Figure 13. Catalyseurs de la réaction de métathèse : (A) Schrock, (B) Grubbs (1^{re} génération) et (C) Grubbs (2^e génération).

La réaction de métathèse a donné lieu à de nouvelles perspectives dans la pétrochimie, l'oléochimie, la chimie des polymères et la chimie de synthèse (Astruc, 2005). La réaction donne souvent accès à des structures qui ne sont disponibles qu'au prix de procédés fastidieux impliquant plusieurs étapes. A titre d'exemple, à partir de la réaction de métathèse, des polyesters, polyamides et autres polymères ont déjà été préparés à partir de sources renouvelables (de Espinosa *et al.*, 2013). Ainsi Kreye *et al.* (2011) ont testé la métathèse de diènes acycliques (ADMET, en

anglais : *Acyclic diene metathesis*) sur des composés dérivés des acides sinapique, férulique et caféique.

Dans les différents domaines cités précédemment, trois types de métathèses peuvent être mis en jeu, la métathèse de fermeture de cycle (RCM), la métathèse de polymérisation par ouverture de cycle et la métathèse croisée (MC). Ces trois métathèses se produisent par voie intra ou intermoléculaire et mettent en œuvre un ensemble de combinaisons possibles. Dans ce qui suit, ne sera décrite que la métathèse croisée (réaction que nous avons employée dans nos fonctionnalisations).

IV.2.2.1.2 La métathèse croisée

La métathèse croisée (MC) est la réaction de transalkylidination entre deux oléfines, en présence d'un catalyseur de Grubbs. De telles réactions sont utiles, par exemple, pour la synthèse des phéromones d'insectes et dans la chimie des huiles et des parfums (Astruc, 2005; Pederson *et al.*, 2002). Statistiquement, la métathèse croisée de deux oléfines peut conduire à trois paires possibles d'isomères géométriques, à savoir les isomères E/Z par homocouplage et les mêmes isomères par hétérocouplage ($R_1\text{-CH=CH-R}_1$, $R_1\text{-CH=CH-R}_2$, et $R_2\text{-CH=CH-R}_2$), soit un total de 6 produits (Figure 14). Il existe, cependant, plusieurs exemples dans lesquels deux alcènes avec une réactivité différente peuvent donner le produit couplé croisé avec d'excellents rendements et une excellente sélectivité.

Outre la chimio- et la régiosélectivité, le contrôle stérique autour de la double liaison formée est un facteur important quant à l'amélioration de l'efficacité de la réaction (Frederico *et al.*, 2005). Ce qui explique le fait que la réaction de métathèse croisée est plus rapide et plus performante lorsque les oléfines mises en jeu sont terminales.

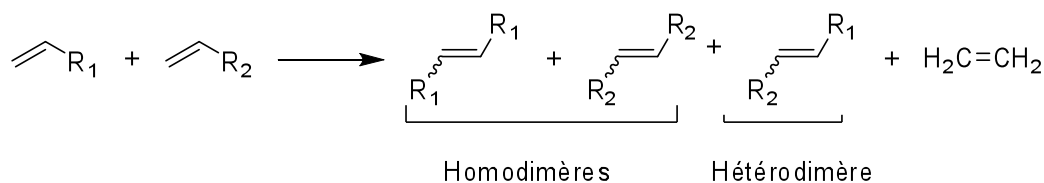


Figure 14. Dimères possibles obtenus par métathèse croisée de deux oléfines terminales. Adapté de Frederico *et al.* (2005).

Il faut, toutefois, noter que les composés ayant des liaisons carbones insaturées ne sont pas tous capables de subir une réaction de métathèse. Des effets électroniques et stériques sont impliqués dans ce cas.

IV.2.2.2 Seconde stratégie : Dimérisation par éthérification

Cette réaction a été réalisée uniquement sur l'eugénol.

La dimérisation par O-alkylation des composés phénoliques naturels est réalisée en les faisant réagir avec un dihalogénure d'alkyle, comme un bromoalcane en présence d'une base (Aouf *et al.*, 2012). Cela permet le couplage de deux molécules aromatiques par éthérification (

Figure 15).

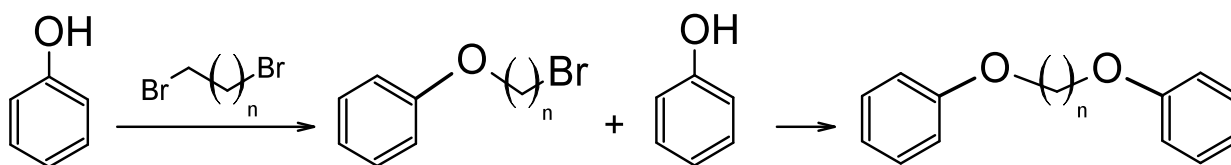


Figure 15. Réaction de O-alkylation d'un phénol avec un n-dibromoalcane.

Dans les deux stratégies citées précédemment, l'introduction du motif époxy s'est effectuée via des réactions de glycidylation ou d'époxydation.

IV.2.2.3 Réactions de glycidylation et d'époxydation

Les composés phénoliques naturels peuvent être glycidylés en une étape par réaction avec l'épichloridrine (Aouf *et al.*, 2014; Aouf *et al.*, 2013; Aouf *et al.*, 2012; Nouailhas *et al.*, 2011), préférentiellement en présence d'une base forte, comme le NaOH (Aouf *et al.*, 2012). Le sel formé est éliminé par filtration et l'épichloridrine résiduelle par évaporation.

Les composés phénoliques naturels portant des doubles liaisons peuvent être également époxydés. Cette époxydation peut être réalisée en présence d'acides

peroxycarboxyliques, mais aussi en présence de catalyseurs et de peroxydes tels que l'eau oxygénée.

Une des voies "vertes" pour l'époxydation d'alcènes est la réaction catalysée par les lipases en présence de faibles quantités d'acides gras insaturés (Bjorkling *et al.*, 1992) (Figure 16). L'une des lipases les plus utilisées dans les procédés de biocatalyse est sans aucun doute la lipase B de *Candida antarctica*.

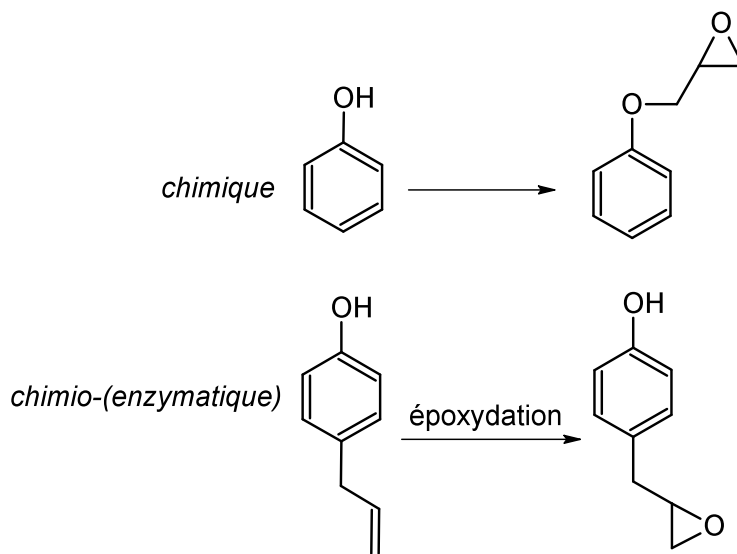


Figure 16. Stratégies de glycidylation et d'époxydation des composés phénoliques.

Outre les réactions classiques d'hydrolyses et d'estérifications biocatalysées par la lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B), cette enzyme s'est par ailleurs révélée très efficace pour la catalyse d'une large gamme de réactions chimiques (Cabrera *et al.*, 2010; Paál *et al.*, 2007), dont la polymérisation (Palmans et Heise, 2010), etc. En présence de peroxyde d'hydrogène, la lipase agit comme une perhydrolase qui catalyse la formation réversible de peracides à partir d'acides carboxyliques (Bernhardt *et al.*, 2005). Les acides sont ainsi convertis en peracides qui réagissent avec des alcènes pour former des dérivés époxy (Aouf *et al.*, 2014). En présence de peroxyde d'hydrogène, cette enzyme ou plus précisément, sa forme immobilisée catalyse la conversion d'acides gras saturés ayant de 4 à 22 atomes de carbone en leurs peroxyacides correspondants.

Cette réaction est normalement utilisée pour l'époxydation d'oléfines, où l'alcène est le nucléophile et le peracide l'électrophile, transporteur d'oxygène (Aouf *et al.*, 2012).

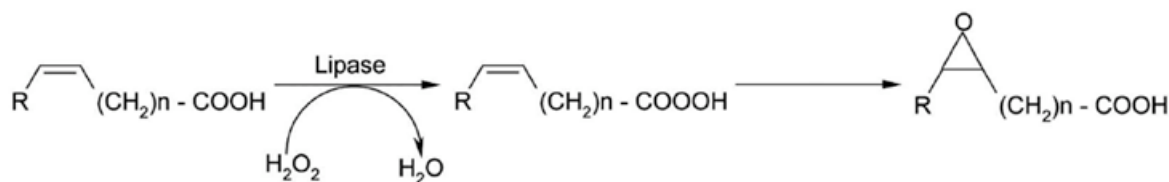


Figure 17. Représentation de la réaction d'époxydation d'une oléfine catalysée par une lipase en présence de peroxyde d'hydrogène et d'acide carboxylique.

Le milieu réactionnel est constitué d'une phase aqueuse contenant du H_2O_2 et une phase organique contenant le substrat et l'acide gras. L'enzyme quant à elle se situe à l'interface de ces deux phases. Cette réaction est typiquement conduite dans des conditions douces de température et génère des époxydes avec des rendements élevés. A la fin de la réaction, la lipase immobilisée est éliminée par filtration et peut être généralement réutilisée. Le principal facteur qui régit le rendement et la vitesse de la réaction d'époxydation catalysée par la lipase est la concentration en peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel. Orellana-Coca *et al.* (2005b) ont montré que l'excès de peroxyde d'hydrogène par rapport à la quantité de doubles liaisons est nécessaire pour atteindre une conversion complète en un temps assez court. Cependant, un grand excès de H_2O_2 a entraîné une accumulation de peroxyacide dans le produit final. Ces peroxyacides n'ayant pas réagi peuvent poser un problème potentiel quant à la sécurité et à la contamination du produit final. De plus, une forte concentration de peroxyde d'hydrogène dans le milieu réactionnel affecte négativement l'activité enzymatique. En effet, en présence de 6 à 12 mols.L^{-1} de H_2O_2 l'enzyme est assez stable aux alentours de 20°C alors qu'à des températures proches de 60°C l'enzyme perd rapidement son activité. Ainsi, la lente addition de H_2O_2 devient importante afin de réduire la désactivation du biocatalyseur (Aouf *et al.*, 2014; Orellana-Coca *et al.*, 2005b; Villeneuve, 2007). La température est également un paramètre important qui influe sur la vitesse de la réaction d'époxydation. Au delà de la température ambiante, un effet positif sur la cinétique de la réaction peut avoir lieu, cependant, des températures supérieures à 50°C entraîneraient la décomposition du peroxyde d'hydrogène et, éventuellement, l'inactivation de l'enzyme. L'effet de la nature du milieu, est également important. La majorité des études implique l'utilisation d'un solvant organique, en particulier le toluène, en vue de faciliter la solubilisation du substrat et donc de faciliter le contact entre le substrat

et le biocatalyseur. Dans les systèmes où le toluène est utilisé, la stabilité de l'enzyme est améliorée.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

I. REACTIFS

Les produits suivants ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) : syringaldéhyde ($\geq 98\%$), vanilline (99%), eugénol (99%), acide malonique (99%), pipéridine ($\geq 99.5\%$), réactif de Folin-Ciocalteu, carbonate de sodium ($\geq 99.5\%$), hydroxyde de sodium (99%), oxyde d'aluminium ($\geq 98\%$), sulfate de magnésium ($\geq 99.5\%$), solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène (30%, m/m), chlorure de *tert*-buthyldimethylsilyl (97%), imidazole ($\geq 99\%$), 1,5-dibromopentane (97%), épichlorhydrine (99%), iodométhane (99%), chlorure de benzyltriéthylammonium ($\geq 98.0\%$), fluorure de tétra-*N*-butylammonium (TBAF) (98%), chlorure de benzyltriéthylammonium (BnEt_3NCl) ($\geq 98\%$), catalyseur de Grubbs de deuxième génération, acides carboxyliques : butanoïque, octanoïque, décanoïque, dodécanoïque, hexadécanoïque et octadécanoïque ($\geq 97\%$), lipase immobilisée de *Candida antarctica*-B (Novozyme 435), huile de tung extraite de graines de *Aleurites fordii* (MM moyenne = 872 g.mol^{-1}), solution de tampon phosphate pH 7,2 (PBS) (réf. N ° 440337), polyoxyéthylène (23), éther de lauryle (Brij 35, MM estimé = 1198 g.mol^{-1}), acide (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylique (Trolox), DPPH (radical 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl libre). La sinapine thiocyanate (99.9%) était de chez Wilshire Technologies Inc. (Princeton, Etats-Unis), l'acide sinapique (98%) et la DBU (2,3,4,6,7,8,9,10-Octahydropyrimido[1,2-*a*]azépine) (99%) de chez Alfa Aesar (Karlsruhe, Allemagne), 2,2'-Azobis(2-méthylpropionamidine)dihydrochloride (AAPH) de chez Wako Chemical (Neuss, Allemagne), les acides acétique glacial et formique de chez Merck (France) et l'acide *n*-hexanoïque de chez SEPPIC (France). Tous les solvants utilisés étaient de qualité HPLC ($>99\%$) ou analytique et ont été fournis également par Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ces solvants ont été utilisés sans distillation préalable.

II. METHODES PREPARATIVES ET ANALYTIQUES

II.1 CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET DENSITOMETRIE

La cinétique des réactions est suivie à partir des prélèvements (50 μL) du milieu réactionnel dilués dans 950 μL de : i) méthanol pour les réactions de synthèse de vinylphénols, ii) dichlorométhane pour les réactions de métathèse ou iii) acétate d'éthyle pour les réactions de lipophilisation (en fonction du système étudié) et filtrés (Millex 0.45 microns Millipore, Bedford, MA, Etats-Unis). 20 μL des solutions décrites précédemment sont déposés sur des plaques de silice (gel de silice F254, 0.25 mm d'épaisseur, Merck, Darmstadt, Allemagne) avec un déposeur automatique (TLC CAMAG AUTOMATIQUE SAMPLER 4, - Muttentz, Suisse). Les composés déposés sur les plaques sont élués avec le mélange *n*-hexane/acétate d'éthyle/acide formique (70/30/1, v/v/v), puis séchés et analysés directement par densitométrie (CAMAG TLC SCANNER 3 - Muttentz, Suisse). Les longueurs d'onde maximales sont déduites à partir des spectres des solutions organiques des molécules dans le domaine de l'UV-visible.

II.2 PURIFICATION DES PRODUITS PAR CHROMATOGRAPHIE FLASH SUR GEL DE SILICE

Après traitement des milieux réactionnels et évaporation du solvant, le brut réactionnel est dissous dans de l'acétate d'éthyle ou du chloroforme (volume final d'environ 10 mL) et 10 g de silice (60 \AA , 63-200 μm) sont ajoutés au ballon. Une fois le solvant évaporé sous vide, la silice imprégnée du produit est introduite dans une cartouche placée dans le système de séparation. Les produits de la réaction sont finalement séparés par chromatographie Flash sur un système CombiFlash® Companion® (Teledyne Isco, Nebraska, USA) en utilisant une colonne de 40 g de silice (RediSep, technologies Serlabo, France). Les extraits sont fractionnés en utilisant un gradient d'élution de *n*-hexane ou éther de pétrole (A) et d'acétate d'éthyle (B). Les longueurs d'onde de détection sont de 273 (canolol), 280 (λ_{max} de composés phénoliques) et 310 nm (sinapine et acide sinapique). Le débit est de 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et la séparation est effectuée à température ambiante. Les molécules pures

sont stockées à -80°C sous atmosphère inerte. Les gradients d'élution de chaque produit seront détaillés ultérieurement.

II.3 ANALYSES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

Les composés phénoliques extraits des tourteaux de colza ont été analysés avec un chromatographe en phase liquide de modèle XR UFLC Shimadzu SIL-20A XR équipé d'un détecteur ultraviolet SPD-M20A (Kyoto, Japon). La séparation est effectuée avec une colonne en silice de phase inverse, C18 modèle 121-2546 ACE (5µm, 250 mm x 4.6 mm, Phenomenex, Le Pecq, France). La méthode d'analyse implique un gradient d'élution en utilisant deux phases mobiles : de l'eau avec 0,1% (v/v) d'acide acétique (A) et du méthanol avec 0,1% (v/v) d'acide acétique (B). Le gradient d'élution appliqué est le suivant : 20 - 40% de B (0-10 min), 40 - 50% de B (10 - 30 min), 50 - 100% de B (30 - 35 min), 100 - 20% de B (35 - 40 min), 20% de B (40 - 45 min). Les longueurs d'onde maximales de détection sont de 273 nm pour le canolol et 310 nm pour l'acide sinapique et la sinapine. Le volume d'injection est de 20 µL, le débit 1 mL.min⁻¹ et la température du four est de 30°C. Les temps de rétention sont de 5.7 minutes pour la sinapine, 12.8 minutes pour l'acide sinapique et 21.0 minutes pour le canolol.

II.4 ANALYSE PAR UPLC-MS

Les analyses sont réalisées en utilisant un spectrophotomètre de masse Brucker Daltonics *Ion Trap* couplé à un chromatographe en phase liquide Ultra Performance (*Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC) Acquity (Waters, Milford, MA) doté d'un détecteur UV-VIS à barrettes de diodes dont la longueur d'onde est fixée à 280 nm (I_{\max} des composés phénoliques). Les échantillons (2 µL) sont injectés, par un échantillonneur automatique, directement sur une colonne C18 Nucleosil 120-3 (100 x 2.1 mm, 5 µm de taille des particules, Machery-Nagel, Suède), à 38°C, avec un débit constant de 550 µL.min⁻¹. La phase mobile est composée d'un mélange de A (H₂O/HCOOH, 99/1, v/v) et B (CH₃CN/H₂O/HCOOH, 80/19/1, v/v/v). Le gradient d'élution est le suivant : t_0 à 0,1% de B ; 0-5 min, 40% de B (élution linéaire) ; 5-8 min, 99% de B (élution linéaire), 8-9 min 0,1% de B (élution linéaire). Les spectres de

masse sont acquis en utilisant l'ionisation électrospray en mode positif et enregistrés dans la gamme de 70 à 1500 amu. Un flux de gaz de séchage de 12 L.min⁻¹, une température de gaz de séchage de 200°C, une pression du nébuliseur de 44 psi et une tension capillaire de 5500 V sont utilisés. Cette technique a été employée pour confirmer la formation des différents produits avant purification et analyse par RMN.

II.5 ANALYSE PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

Les spectres RMN ont été obtenus sur deux spectromètres différents :

- Un spectromètre Agilent 500 MHz VNRMS DD2, fonctionnant à 500MHz pour ¹H et 125,75 MHz pour ¹³C, en utilisant une sonde de détection Z-gradient indirecte de 5 mm. Dans ce cas, les composés sont dissous dans du DMSO-*d*₆ et leurs déplacements chimiques sont exprimés par rapport au DMSO à 2,5 ppm et 39,5 ppm pour ¹H et ¹³C respectivement.
- Un spectromètre Bruker 400 MHz (Bremen, Allemagne), fonctionnant à 400 MHz pour ¹H et 100 MHz pour ¹³C. Les composés sont dilués dans du CDCl₃ et leurs déplacements chimiques sont mesurés par rapport aux signaux résiduels internes du CHCl₃ à 7.26 ppm et 77.0 ppm pour ¹H et ¹³C respectivement.

L'identification et la caractérisation des structures des différents produits sont effectuées en utilisant la spectrométrie RMN 1D et 2D homonucléaire et hétéronucléaire. Les données sont traitées et analysées en utilisant à la fois les logiciels VNMRJ et ACD/Labs.

II.6 ANALYSES ELEMENTAIRES

Les analyses élémentaires ont été effectuées par combustion sur Flash EA 1112 (thermoFinnigan 2003).

II.7 ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques (analyse unidirectionnelle de variance, ANOVA) sont réalisées sur les valeurs moyennes obtenues à partir des 3 répétitions en utilisant le logiciel JMP v.8. (SAS Institute, USA). Les moyennes sont comparées en utilisant le test t de Student. Le niveau α de signification de l'analyse statistique est fixé à 0.05.

**Partie I : Effet des traitements
thermiques, de l'hydratation et du
temps d'incubation sur la teneur
en composés phénoliques totaux
et individuels (sinapine, acide
sinapique et canolol) des
tourteaux de colza**

III. MATIERES PREMIERES ET TRAITEMENTS APPLIQUES

III.1 DESCRIPTION ET CLASSIFICATION DES TRAITEMENTS INDUSTRIELS APPLIQUES AUX ECHANTILLONS DE TOURTEAU DE COLZA

Un lot commercial de 150 kg de graines de colza (teneur en glucosinolates = $18.1 \mu\text{mol.g}^{-1}$) a été acheté chez Arterris (Castelnaudary, Aude - France). La matière a été traitée à l'usine du CREOL (Pessac-France) qui possède un pilote d'extraction d'huile d'une capacité de 200 kg.h^{-1} . L'échantillon 1 se réfère aux graines de colza, l'échantillon 2 (gâteau) correspond aux graines après un pressage mécanique à froid (processus de déshuilage sur une presse MBU 20) (Tableau 3) (Figure 18).



Figure 18. Presse MBU 20, capacité de 100 kg.h^{-1} . Processus de pressage mécanique à froid des graines de colza. Sortie de l'huile brute.

L'échantillon 3 (tourteau de colza) est le produit issu du processus de déshuilage de l'échantillon 2 avec du *n*-hexane. Le processus de désolvantisation a été réalisé sous vide à 50°C pour éviter la dénaturation des enzymes endogènes dans les matières premières. L'échantillon 3 a été soumis à différents traitements d'hydratation/incubation et cuisson, comme décrit dans le Tableau 2. Ces procédés ont mené aux échantillons 4-15 (Tableau 2, Figure 19).

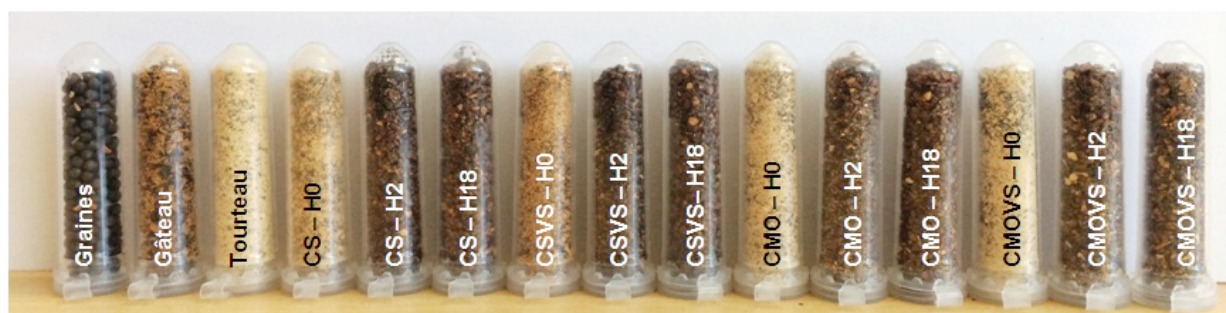
Tableau 2. Description des échantillons.

Ref. Echantillons	Description
1 Graines	Graines de colza
2 Gâteau	Ecailles de pression (graines pressées)
3 Tourteau	Tourteau non cuit (Gâteau déshuilé - <i>n</i> -hexane)
4 CS-H0	Cuisson simple à 105°C (t=52 min) - sans prétraitement*
5 CS-H2	Cuisson simple à 105°C (t=50 min) - avec un prétraitement de 2h d'incubation**
6 CS-H18	Cuisson simple à 105°C (t=59 min) - avec un prétraitement de 18h d'incubation***
7 CSVS-H0	Cuisson simple avec une injection de vapeur surchauffée, T=160°C (t=47 min) - sans prétraitement
8 CSVS-H2	Cuisson simple avec une injection de vapeur surchauffée, T=160°C (t=50 min) - avec un prétraitement de 2h d'incubation
9 CSVS-H18	Cuisson simple avec une injection de vapeur surchauffée, T=160°C (t=51 min) - avec un prétraitement de 18h d'incubation
10 CMO-H0	Cuisson par micro-ondes, T=160°C (t=5 min 33) - sans prétraitement
11 CMO-H2	Cuisson par micro-ondes, T=160°C (t=6 min 15) - avec un prétraitement de 2h d'incubation
12 CMO-H18	Cuisson par micro-ondes, T=160°C (t=6 min 15) - avec un prétraitement de 18h d'incubation
13 CMOVS-H0	Cuisson par micro-ondes (t=6 min 15), T=160°C avec une injection de vapeur surchauffée T=180°C - sans prétraitement
14 CMOVS-H2	Cuisson par micro-ondes (t=6 min 15), T=160°C avec une injection de vapeur surchauffée T=180°C - avec un prétraitement de 2h d'incubation
15 CMOVS-H18	Cuisson par micro-ondes (t=6 min 15), T=160°C avec une injection de vapeur surchauffée T=180°C - avec un prétraitement de 18h d'incubation

*Sans prétraitement = tourteau non-hydraté.

**Prétraitement de 2h (H2) = hydratation, malaxage pendant 2 heures à $32 \pm 2^\circ\text{C}$, suivie d'une étape de séchage à 70°C pour 1h15.

***Prétraitement de 18h (H18) = hydratation, malaxage pendant 18 heures à $32 \pm 2^\circ\text{C}$, suivie d'une étape de séchage à 70°C pour 1h15.

**Figure 19.** Les 15 échantillons de colza étudiés.

III.1.1 Etape d'hydratation

Le tourteau obtenu lors de la troisième étape du processus (échantillon 3, avec une teneur en eau de 10,3% m/m) est divisé en trois parties égales (section I.1 du chapitre 3, Figure 25). La première portion ne subit aucun traitement (H0) tandis que les deux autres sont hydratées à $21,4 \pm 0,1\%$ (m/m) avec de l'eau et ensuite incubées à $32 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 2 (H2) et 18 heures (H18). Après incubation, les fractions H2 et H18 sont séchées en les étalant en couche mince et en les retournant fréquemment pendant 1h15 dans un cabinet d'air chaud à 70°C . Cette étape est réalisée pour vérifier la possibilité d'une hydrolyse enzymatique endogène de la sinapine présente dans le tourteau, avec une libération consécutive d'acide sinapique susceptible d'être décarboxylé en canolol par les traitements thermiques.

III.1.2 Traitements thermiques

Tous les échantillons de tourteau (H0, H2 et H18) ont été soumis à divers traitements thermiques industriels comme décrit ci-dessous :

- CS : Cuisson simple - Ce traitement a pour objectif de reproduire les conditions de température et d'humidité de la désolvantisation appliquée classiquement en industrie. Les échantillons sont préchauffés à 80°C dans un mini cuiseur sous agitation laminaire puis exposés à une injection de vapeur d'eau pour atteindre 105°C . Les échantillons sont maintenus à cette température pendant 50 à 60 minutes.
- CSVS : Cuisson simple avec une injection de vapeur surchauffée - Le tourteau est préchauffé à $80-90^\circ\text{C}$. Ensuite, une injection de vapeur d'eau de 180 à 200°C est appliquée pour atteindre une température de 160°C qui est maintenue pendant 47 à 51 minutes.
- CMO : Cuisson par micro-ondes (2.45 GHz et 10kW) - Le tunnel du four à micro-ondes est conditionné pour atteindre la température souhaitée de 160°C de la manière suivante : le tunnel est d'abord alimenté par des flocons de colza pour

éviter de fonctionner avec une bande vide. Le taux d'alimentation du tunnel est de 50 kg.h⁻¹. La bande de transport sur laquelle les tourteaux sont transportés dans le tunnel a une vitesse linéaire de 4 mm.s⁻¹. La puissance est réglée pour obtenir une température de 160°C au centre du tunnel. Le temps de séjour des échantillons dans la partie active du tunnel est de 375 secondes (6 min 15), sauf pour l'échantillon CMO-H0 (sans traitement d'hydratation) qui est resté dans le tunnel pendant 333 secondes (5 min 33). Après traitement, le matériau est refroidi par diffusion.

- CMOVS : Cuisson par micro-ondes (2,45 GHz et 10 kW) avec une injection de vapeur surchauffée - Sur le matériau obtenu lors de la précédente étape (CMO), une injection de vapeur surchauffée à 180°C (2 kg.h⁻¹) est appliquée au cœur de la partie active du tunnel, à environ 10 mm au-dessus du fond du tunnel.

III.2 CARACTERISATION DES ECHANTILLONS DE TOURTEAU DE COLZA

Avant les étapes d'extraction et d'analyse des composés phénoliques présents dans les différents tourteaux de colza, les 15 échantillons sont soumis au broyage dans un broyeur à billes (broyeur à boulet Retsch, VWR, France). Pour cela, 10 g d'échantillon sont broyés pendant 5 min et à une fréquence de 50 Hz. Ensuite, les échantillons sont délipidés (section III.2.2, chapitre 2).

Toutes les déterminations ont été répétées trois fois.

III.2.1 Teneur en eau

Une capsule sèche, propre à ce type de mesure, est pesée (M1). Ensuite, environ 2 g d'échantillon sont pesés dans cette capsule (M2). Les capsules contenant l'échantillon sont maintenues dans une étuve à 105°C pendant 4 jours. A la fin de cette période, les échantillons sont placés directement dans un dessiccateur pendant 1 heure puis pesés (M3).

Ainsi :

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \frac{(M2 - M3) \cdot 100}{M2 - M1}$$

Où :

Teneur en eau = humidité de l'échantillon (en pourcentage, %)

M1 = masse de la capsule sec (g)

M2 = masse de l'échantillon avant dessiccation (g)

M3 = masse de l'échantillon sec + capsule sec (g).

III.2.2 Teneur en huile

Dans chaque cartouche sèche, adaptée à ce procédé, 8 g de tourteau broyé sont pesés. Comme cité précédemment, les lipides sont extraits par un extracteur de type Soxhlet avec de l'éther de pétrole à 40-45°C pendant 8 heures. Puis, le solvant est évaporé sous pression réduite à 30°C à l'aide d'un évaporateur rotatif Heidolph laborata 4000 (Schwabach, Allemagne). La teneur en huile de chaque échantillon est calculée à partir de la différence entre la masse initiale du récipient (vide et sec) et sa masse finale contenant l'huile après délipidation. Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'huile par gramme de tourteau sec.

III.2.3 Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques est réalisée en suivant le procédé décrit par Cai et Arntfield (2001) en utilisant un rapport solvant/échantillon de 100/1 (v/m). Typiquement, 50 mg d'échantillon déshuilé sont pesés dans un tube à essai avec bouchon à vis et 5 mL de méthanol sont ajoutés. Les tubes fermés sont maintenus sous agitation magnétique dans un bain d'huile à 75°C pendant 20 minutes. Ensuite, les tubes sont refroidis à température ambiante et centrifugés pendant 5 minutes à 4000 rpm. La phase méthanolique est recueillie et le procédé d'extraction répété une seconde fois. Les deux extraits méthanoliques ont été rassemblés, et le solvant a été évaporé sous atmosphère d'azote inerte. Les extraits secs ont été conservés à -20°C.

III.2.4 Teneur en composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu adaptée par Vuorela *et al.* (2004). Le principe de cette technique est basé sur la réduction de l'acide phospho-molybdène-tungstène (réactif de Folin) en solution alcaline (Figure 20).

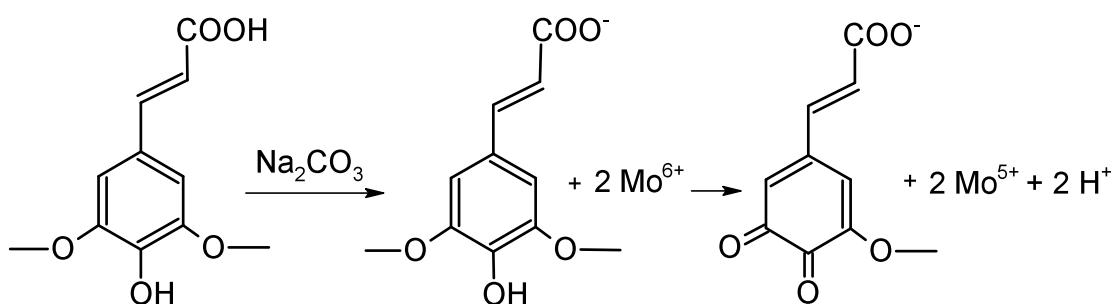


Figure 20. Réaction de réduction du molybdène (réactif de Folin) par l'acide sinapique, en présence de carbonate de sodium.

Pour cela, les extraits secs obtenus après extraction (section III.2.3, chapitre 2) ont été resolubilisés dans 5 mL d'une solution méthanol/eau (1/2, v/v). Dans une cuvette en plastique de 3,5 mL, ont été mélangés 0,2 mL d'extrait avec 0,8 mL d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (7,5%, m/v). Ensuite, 1 mL d'une solution aqueuse de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois) a été ajouté à ce milieu. Après 90 min d'incubation, la cuvette a été placée dans un spectrophotomètre UV-Vis Perkin Elmer Lambda 25 modèle (Shelton, USA) permettant une agitation magnétique et un contrôle de la température (25°C) et l'absorbance de chaque solution mesurée à 765 nm. La concentration totale en composés phénoliques est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage établie en prenant l'acide sinapique comme composé phénolique étalon à des concentrations comprises entre 12,5 à 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ d'acide sinapique dilué dans la même solution méthanol/eau (1/2, v/v) ($R^2 = 0,9973$). Les résultats sont exprimés en équivalents d'acide sinapique (EAS) en micromoles par gramme de matière sèche ($\mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$).

III.2.5 Teneurs en sinapine, acide sinapique et canolol

La teneur individuelle en composés phénoliques d'intérêt (sinapine, acide sinapique et canolol) dans chaque échantillon est quantifiée par chromatographie en phase liquide (Section II.3, chapitre 2). Pour cela, les extraits secs obtenus (section III.2.3, chapitre 2) sont resolubilisés dans 5 mL de méthanol puis filtrés (Millex 0,45 μm , Millipore, Bedford, MA, USA) et analysés par HPLC (Section II.3, chapitre 2).

Les courbes d'étalonnage externes ont été obtenues à partir de solutions méthanoliques de thiocyanate de sinapine ($368,45 \text{ g.mol}^{-1}$), d'acide sinapique ($224,21 \text{ g.mol}^{-1}$) et de canolol ($179,23 \text{ g.mol}^{-1}$). Les concentrations de ces solutions étaient comprises entre $0,0025$ à $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ avec $R^2 = 0,9960$ pour la sinapine, $R^2 = 0,9997$ pour l'acide sinapique et $R^2 = 0,9998$ pour le canolol (Figure 21).

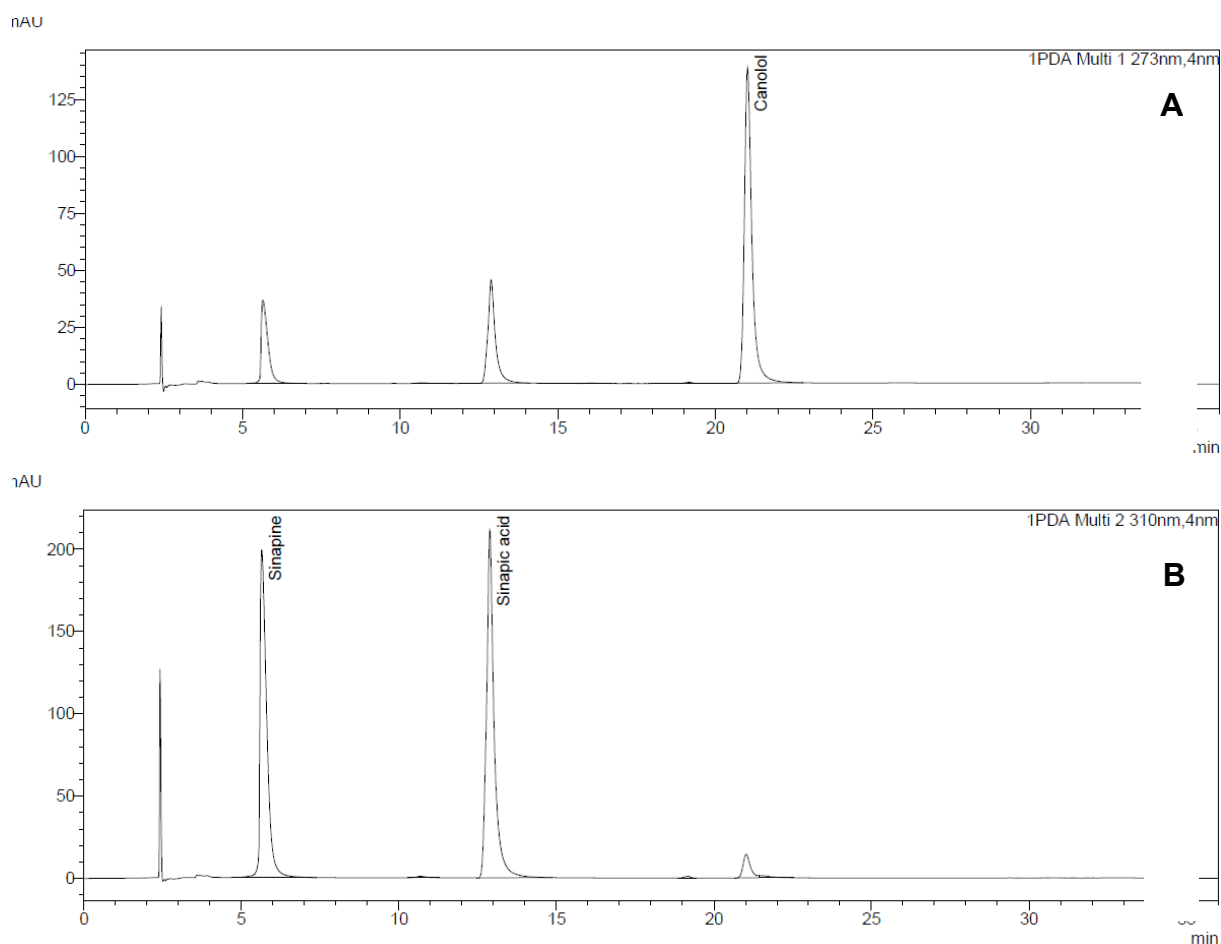


Figure 21. Chromatogrammes de la solution contenant les étalons de canolol, sinapine et acide sinapique à (A) 273 nm et (B) 310 nm.

Partie II : Synthèse de Vinylphénols

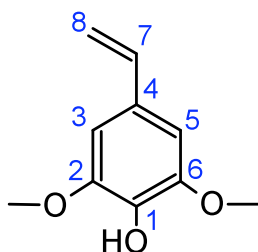
IV. SYNTHÈSE DU CANOLOL ET DU 4-VINYLGUAIACOL A PARTIR DE LEURS HYDROXYBENZALDEHYDES CORRESPONDANTS

La méthodologie utilisée dans cette synthèse s'inspire des travaux de Simpson *et al.* (2005). Cette méthode décrit la préparation de vinylphénols à partir d'hydroxybenzaldéhydes selon la réaction de condensation de Knoevenagel-Doebner. Dans le cas du canolol **1**, l'aldéhyde utilisé est le syringaldéhyde (4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzaldéhyde). Pour la synthèse du 4-vinylguaiacol **2**, le substrat employé est la vanilline (4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde).

Dans un ballon de 100 mL, l'hydroxybenzaldéhyde (5 mmoles), l'acide malonique (20 mmoles) et la pipéridine (7.6 mmoles) sont dissous dans du toluène (21 mL). Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation magnétique (200 rpm) et sous reflux dans un bain d'huile à 115°C. La transformation de l'hydroxybenzaldéhyde est suivie par chromatographie sur couche mince et densitométrie (Section II.1, chapitre 2). Pour le traitement, le milieu réactionnel a été refroidi à température ambiante et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Afin d'éliminer toute trace de pipéridine, cette étape a été réalisée deux fois en ajoutant 20 mL de toluène au précipité. Ce mélange est évaporé une deuxième fois sous vide pour l'élimination totale de tout solvant résiduel. Le produit brut a été purifié par chromatographie Flash (section II.2, chapitre 2) en utilisant un mélange éther de pétrole (A)/acétate d'éthyle (B) et le gradient d'élution suivant : 30 - 100% de B (0 - 65 min). Ce qui a fourni les produits suivants :

2,6-diméthoxy-4-vinylphénol (canolol) 1:

Rendement: 47% (2.35 mmoles).



RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3):

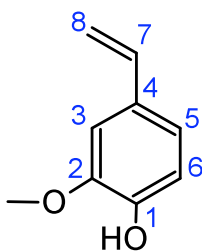
δ = 6.65 (s, 1H, H3, H5), 6.62 (dd, J = 17.5, 10.9 Hz, 1H, H7), 5.15 (d, J = 10.9 Hz, 1H, H8), 5.60 (d, J = 17.5 Hz, 1H, H8), 3.91 (s, 6H, Me), 5.53 (s, 1H, OH) ppm.

RMN ^{13}C (150 MHz, CDCl_3):

δ = 135.3 (C1), 147.5 (2C, C2 and C6), 103.3 (2C, C3 and C5), 129.5 (C4), 137.1 (C7), 112.0 (C8), 56.7 (Me) ppm. $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ calcd. C 66.65, H 6.54 ; found. C 66.42, H 6.54.

2-methoxy-4-vinylphenol (4-vinylguaiacol) 2:

Rendement: 74% (3.7 mmoles).



RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):

δ = 7.04 (s, 1H, H3), 6.72 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H5), 6.85 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H6), 6.61 (dd, J = 17.6, 10.9 Hz, 1H, H7), 5.06 (d, J = 11.1 Hz, 1H, H8), 6.63 (d, J = 16.8 Hz, 1H, H8), 3.79 (s, 3H, Me), 9.07 (s, 1H, OH) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$):

δ = 146.3 (C1), 147.6 (C2), 109.4 (C3), 128.5 (C4), 119.4 (C5), 115.02 (C6), 136.3 (C7), 110.7 (C8), 55.3 (Me) ppm. $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2$ calcd. C 71.98, H 6.71 ; found. C 72.08, H 6.60.

Partie III : Réactions de Fonctionnalisation

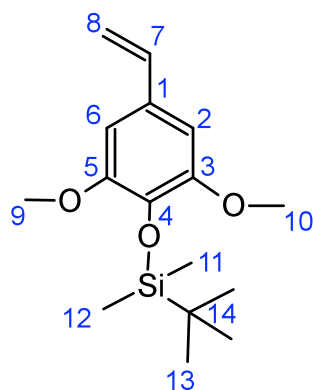
V. Réactions de Lipophilisation

V.1 PROTECTION DE L'HYDROXYLE PHENOLIQUE PAR SILYLATION

Sous argon et sous agitation (200 rpm), dans un ballon à fond rond, une solution de chlorure de *tert*-buthyldimethylsilyl (1,2 mmoles) dans 2 mL de DMF, est ajoutée goutte à goutte à une solution de 1 mmole du composé **1** ou **2** et 2,5 mmoles d'imidazole dans 3 mL de DMF. L'agitation est maintenue pendant 26 heures à température ambiante. A la fin de la réaction, 25 mL d'eau et 25 mL d'acétate d'éthyle sont additionnés. La phase aqueuse est séparée et extraite avec de l'acétate d'éthyle (2 x 25 mL). Les phases organiques combinées sont lavées avec de la saumure (30 mL), séchées sur MgSO₄ anhydre et concentrées sous vide. La purification des produits a été réalisée par chromatographie FLASH (section II.2, chapitre 2) avec comme éluant un mélange éther de pétrole (A)/acétate d'éthyle (B) et le gradient d'élution suivant : 5% de B (0 - 5 min), 5 - 10% de B (5 - 10 min), 10 - 15% de B (10 - 20 min), 15 - 20% de B (20 - 25 min), 20 - 30% de B (30 - 40 min).

Tert-butyl(2,6-diméthoxy-4-vinylphénoxy)diméthylsilane **3**:

Rendement: 74% (0.46 mmoles).



RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):

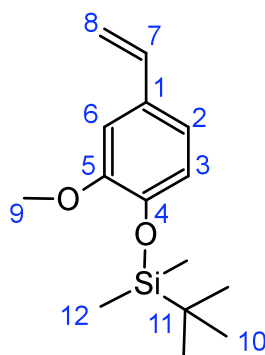
δ = 6.67 (2H, H6), 6.69 (t-10.8, H7), 5.21-5.67 (dd, H8), 3.87 (s, 9H, H10), 0.19 (s, 11H, H12), 1.07 (s, H13) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 130.3 (C1), 103.4 (C2, C6), 152 (C5, C3), 134.7 (C4), 136.7 (C7), 112.2 (C8), 55.9 (C9, C10), 4.6 (C11, C12), 25.8 (C13), 18.6 (C14) ppm. $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Si}$.

Tert-butyl(2-methoxy-4-vinylphenoxy)dimethylsilane 4:

Rendement: 85% (0.83 mmoles).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):

δ = 0.18 (s, 6H, H12), 1.02 (s, 9H, H10), 3.84 (s, 3H, H9), 5.14 (dd, J = 10.8, 0.91 Hz, 1H, H8), 5.61 (dd, J = 17.6, 0.91 Hz, 1H, H8), 6.65 (dd, J = 17.6, 10.9 Hz, 1H, H7), 6.81 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H2), 6.88 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H, H3), 6.94 (s, 1H, H6) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 131.7 (C1), 119.4 (C2), 120.4 (C3), 145.1 (C4), 151.0 (C5), 109.6 (C6), 136.7 (C7), 111.7 (C8), 55.4 (C9), 25.7 (C10), 18.4 (C11), 4.6 (C12) ppm. $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Si}$ calcd. C 68.13, H 9.15, Si 10.62 ; found. C 70.02, H 8.89, Si 11.31.

V.2 LIPOPHILISATION DU PRODUIT SILYLE

Dans un ballon à fond rond de 50 mL équipé d'un barreau magnétique, 2 mmoles d'acide carboxylique (différents acides carboxyliques ont été utilisés), 3 mmoles de peroxyde d'hydrogène à 30% (m/v) et l'enzyme (Novozyme 435, 10%, m/m, par rapport à la masse de **3** ou **4**) sont ajoutés dans 2 mL de toluène. Après 30 min d'agitation à 40°C dans un bain d'huile, 500 μL d'une solution contenant le composé silylé **16** (1 mmole) dans du toluène (1 mL) sont rajoutés par fractions au milieu réactionnel toutes les 30 minutes (l'addition dure 2 h). La synthèse est suivie par CCM (section II.1, chapitre 2).

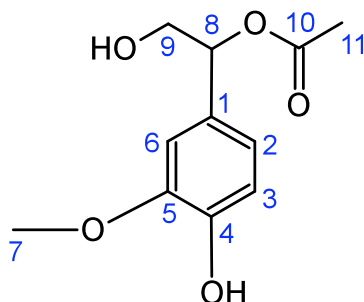
Lorsque le substrat **16** est complètement consommé, la réaction est arrêtée et le catalyseur est éliminé du milieu réactionnel par filtration sur verre fritté. Le milieu réactionnel filtré est lavé avec 30 mL d'eau. La phase aqueuse est séparée et extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 30 mL). Les phases organiques combinées sont lavées avec de la saumure (40 mL), séchées sur du MgSO_4 anhydre et concentrées sous vide. La déprotection du groupe phénolique est réalisée sur les produits bruts.

V.3 DEPROTECTION DU GROUPEMENT HYDROXYLE PHENOLIQUE : ELIMINATION DU GROUPEMENT SILYLE

Pour la déprotection de l'hydroxyle phénolique, le produit brut formé lors de la réaction décrite précédemment est dilué dans 2 mL de THF anhydre et la solution est refroidie à 0°C. Sous argon, sont ajoutés, goutte à goutte, 2 mL d'une solution de fluorure de tétra-*N*-butylammonium (TBAF) (1.2 mmoles) dans 2 mL de THF à la solution précédente. Après 3 heures à 0°C, 25 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel. La phase aqueuse est séparée et extraite avec de l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques combinées sont lavées avec de la saumure (30 mL), séchées sur MgSO_4 anhydre et concentrées sous vide. La purification des produits a été réalisée par chromatographie FLASH (section II.2, chapitre 2) avec comme éluant un mélange éther de pétrole (A)/acétate d'éthyle (B) et le gradient d'élution suivant : 10 - 15% de B (0 - 5 min), 15 - 20% B (5 - 10 min), 20 - 30% de B (10 - 15 min), 30 - 35% de B (15 - 20 min), 35 - 40% de B (20 - 25 min), 40 - 45% de B (25 - 30 min), 45 - 50% de B (30 - 40 min), 50 - 55% de B (40 - 45 min), 55 - 60% de B (45 - 50 min), 60 - 65% de B (50 - 55 min), 65 - 70% (55 - 65 min).

2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)ethyl acétate 5a.

Rendement: 33% (0.32 mmoles). 30% (m/m) d'enzyme est utilisé.



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):

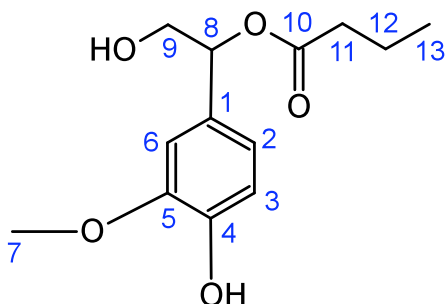
δ = 6.87(d, J = 8.46 Hz, 1H, H2), 6.91 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H3), 6.93 (s, 1H, H6), 3.91 (s, 3H, H7), 4.89 (dd, J = 8.6, 3.4 Hz, 1H, H8), 4.15 (dd, J = 11.60, 4.60 Hz, 1H, H9), 4.25 (dd, J = 11.60, 3.40 Hz, 1H, H9), 2.12 (s, 3H, H11), 5.67 (s, 1H, OH aliphatic) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 131.7 (C1), 119.2 (C2), 114.3 (C3), 145.6 (C4), 146.7 (C5), 108.6 (C6), 56.0 (C7), 72.3 (C8), 69.4 (C9), 171.2 (C10), 20.9 (C11) ppm. $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_5$ calcd. C 58.40, H 6.24 ; found. C 58.73, H 6.52.

2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)ethyl butyrate 5b.

Rendement: 26% (0.25 mmoles). 20% (m/m) d'enzyme est utilisé.



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):

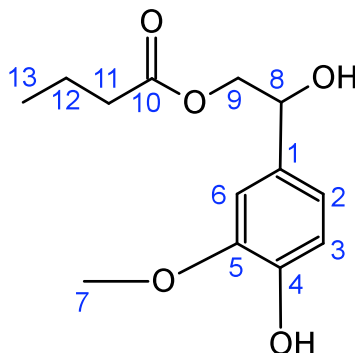
δ = 6.86 (d, J = 8.46 Hz, 1H, H2), 6.89 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H3), 6.92 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, H7), 5.79 (dd, J = 7.6, 4.3 Hz, 1H, H8), 3.79 (dd, J = 11.9, 4.3 Hz, 1H, H9), 3.88 (m, 1H, H9), 2.37 (t, J = 7.0 Hz, 2H, H11), 1.69 (td, J = 14.8, 7.4 Hz, 2H, H12), 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H13), 5.68 (s, 1H, OH aliphatic), ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 129.0 (C1), 119.8 (C2), 114.5 (C3), 145.8 (C4), 146.5 (C5), 109.5 (C6), 55.9 (C7), 76.5 (C8), 66.0 (C9), 173.3 (C10), 36.3 (C11), 18.4 (C12), 13.6 (C13) ppm.
 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5$ calcd. C 61.40, H 7.14 ; found. C 61.29, H 7.23.

2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl butyrate 6b.

Rendement: 22% (0.21 mmoles). 20% (m/m) d'enzyme est utilisé.



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):

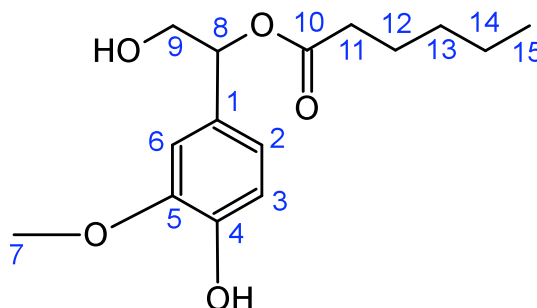
δ = 6.85 (dd, J = 8.10, 1.60 Hz, 1H, H2), 6.89 (d, J = 8.10 Hz, 1H, H3), 6.94 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, H7), 4.89 (dd, J = 8.4, 3.4 Hz, 1H, H8), 4.16 (dd, J = 11.50, 8.5 Hz, 1H, H9), 4.25 (dd, J = 11.5, 3.4 Hz, 1H, H9), 2.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H, H11), 1.68 (td, J = 14.8, 7.4 Hz, 2H, H12), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H, H13), 5.68 (s, 1H, OH aliphatic) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 131.8 (C1), 119.2 (C2), 114.3 (C3), 145.5 (C4), 146.6 (C5), 108.6 (C6), 55.9 (C7), 73.3 (C8), 69.2 (C9), 173.8 (C10), 36.0 (C11), 18.4 (C12), 13.6 (C13) ppm.
 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5$ calcd. C 61.40, H 7.14 ; found. C 60.97, H 7.02.

2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl hexanoate 5c.

Rendement: 43% (0.41 mmoles).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):

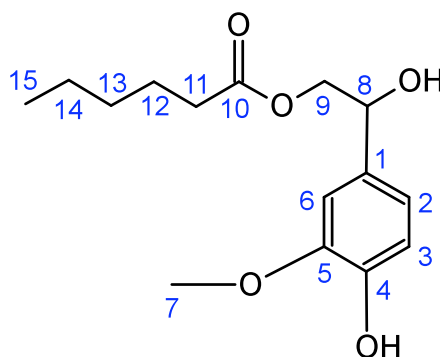
δ = 0.90 (t, J = 6.73 Hz, 3H, H15), 1.26-1.33 (m, 4H, H14, H13), 1.63(m, 2H, H12), 2.37 (t, J = 7.65 Hz, 2H, H11), 3.78 (dd, J = 11.94, 4.27 Hz, 1H, H9), 3.87-392 (m, 1H, H9), 3.88 (s, 3H, H7), 4.34 (t, J = 7.05 Hz, 1H, OH aliphatic), 5.78 (dd, J = 7.58, 4.32 Hz, 1H, H8), 6.85 (m, 1H, H2), 6.88 (bs, 1H, H3), 6.90 (s, 1H, H6) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 129.0 (C1), 119.7 (C2), 109.6 (C3), 145.4 (C4), 146.5 (C5), 114.5 (C6), 55.9 (C7), 76.4 (C8), 65.9 (C9), 173.5 (C10), 34.4 (C11), 24.1 (C12), 31.3 (C13), 22.3 (C14), 13.8 (C15) ppm. $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$ calcd. C 63.81, H 7.85 ; found. C 63.74, H 7.73.

2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl hexanoate 6c.

Rendement: 32% (0.3 mmol).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):

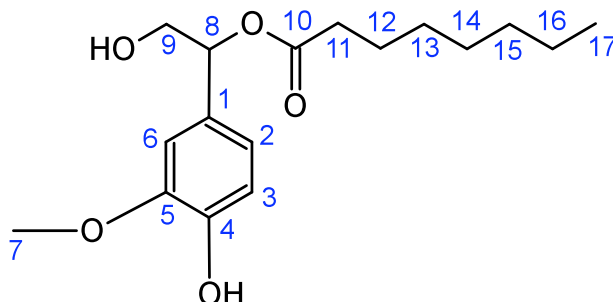
δ = 6.85 (dd, J = 8.10, 1.60 Hz, 1H, H2), 6.89 (d, J = 8.10 Hz, 1H, H3), 6.94 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, H7), 4.90 (dd, J = 8.41, 3.39 Hz, 1H, H8), 4.17 (dd, J = 11.50, 3.07 Hz, 1H, H9), 4.26 (dd, J = 11.55, 3.44 Hz, 1H, H9), 2.36 (t, J = 7.55 Hz, 2H, H11), 1.64 (m, 2H, H12), 1.31-1.32 (m, 2H, H13), 1.26-1.30 (m, 2H, H14), 0.90 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H15), 5.67 (s, 1H, OH aliphatic) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 131.8 (C1), 119.3 (C2), 114.3 (C3), 145.6 (C4), 146.7 (C5), 108.6 (C6), 55.9 (C7), 73.3 (C8), 69.2 (C9), 174.0 (C10), 34.3 (C11), 24.1 (C12), 31.3 (C13), 22.3 (C14), 13.9 (C15) ppm. $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_5$ calcd. C 63.81, H 7.85 ; found. C 64.12, H 7.95.

2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl octanoate 5d.

Rendement: 46% (0.45 mmoles).

**RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3):

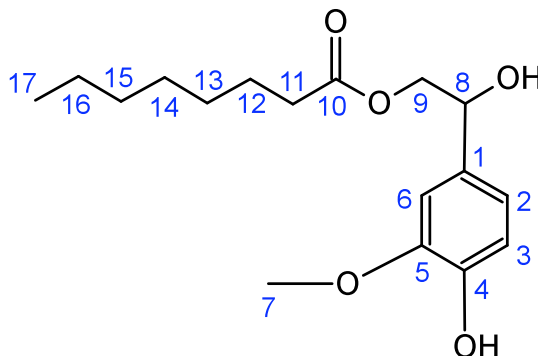
δ = 6.86 (d, J = 8.46 Hz, 1H, H2), 6.89 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H3), 6.91 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, H7), 5.79 (dd, J = 7.60, 4.30 Hz, 1H, H8), 3.78 (dd, J = 11.90, 4.30 Hz, 1H, H9), 3.86 (m, 1H, H9), 2.38 (t, J = 7.40 Hz, 2H, H11), 1.62-1.66 (m, 2H, H12), 1.26-1.1.29 (m, 8H, H13-H16), 0.88 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H17), 5.65 (s, 1H, OH aliphatique) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 129.0 (C1), 119.8 (C2), 114.5 (C3), 145.8 (C4), 146.5 (C5), 109.5 (C6), 55.9 (C7), 76.5 (C8), 66.0 (C9), 173.5 (C10), 34.5 (C11), 25.0 (C12), 31.6 (C13), 29.0 (C14), 28.8 (C15), 22.5 (C16), 14.0 (C17) ppm. $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_5$ calcd. C 65.78, H 8.44 ; found. C 65.67, H 8.51.

2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl octanoate 6d.

Rendement: 30% (0.29 mmoles).

**RMN ^1H** (400 MHz, CDCl_3):

δ = 6.86 (dd, J = 8.50, 1.80 Hz, 1H, H2), 6.89 (d, J = 8.10 Hz, 1H, H3), 6.94 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, H7), 4.89 (dd, J = 8.40, 3.40 Hz, 1H, H8), 4.16 (dd, J = 11.50, 3.58 Hz, 1H, H9), 4.25 (dd, J = 11.50, 3.50 Hz, 1H, H9), 2.36 (t, J = 7.50 Hz, 2H, H11), 1.64

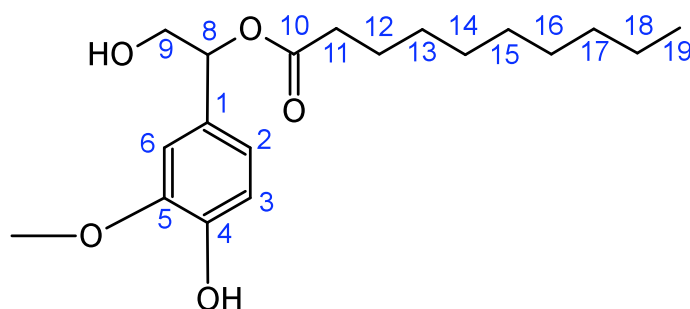
(m, 2H, H12), 1.28-1.33 (m, 8H, H13-H16), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H17), 5.66 (s, 1H, OH aliphatique) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 131.8$ (C1), 119.2 (C2), 114.3 (C3), 145.6 (C4), 146.7 (C5), 108.5 (C6), 55.9 (C7), 73.3 (C8), 69.2 (C9), 174.0 (C10), 34.2 (C11), 24.9 (C12), 31.6 (C13), 29.0 (C14), 28.8 (C15), 22.35 (C16), 14.0 (C17) ppm. $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_5$ calcd. C 65.78, H 8.44 ; found. C 65.91, H 8.36.

2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl decanoate 5e.

Rendement: 43% (0.42 mmoles).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):

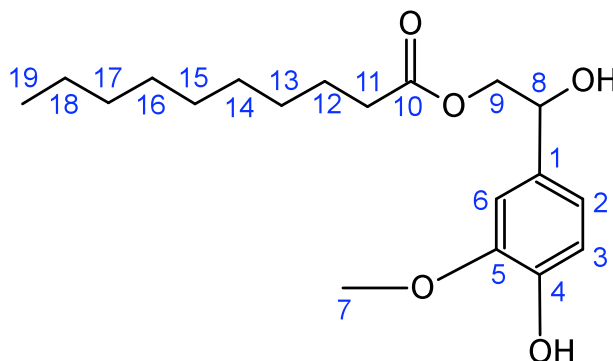
$\delta = 6.87$ (dd, $J = 8.20, 1.80$ Hz, 1H, H2), 6.89 (d, $J = 8.10$ Hz, 1H, H3), 6.90 (s, 1H, H6), 3.91 (s, 3H, H7), 5.78 (dd, $J = 7.6, 4.3$ Hz, 1H, H8), 3.79 (dd, $J = 11.9, 4.3$ Hz, 1H, H9), 3.88 (m, 1H, H9), 2.36 (t, $J = 7.50$ Hz, 2H, H11), 1.64 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H, H12), 1.27-1.31 (m, 12H, H13-H18), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H19), 5.65 (s, 1H, OH aliphatique) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

$\delta = 129.1$ (C1), 119.8 (C2), 114.5 (C3), 145.8 (C4), 146.5 (C5), 109.5 (C6), 56.0 (C7), 76.4 (C8), 65.9 (C9), 174.0 (C10), 34.2 (C11), 25.0 (C12), 29.4 (C13), 29.1 (C14), 29.2 (2C, C15-C16), 22.6 (C17), 31.8 (C18), 14.1 (C19) ppm. $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_5$ calcd. C 67.43, H 8.93 ; found. C 67.32, H 9.03.

2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl decanoate 6e.

Rendement: 31% (0.30 mmoles).

**RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃):

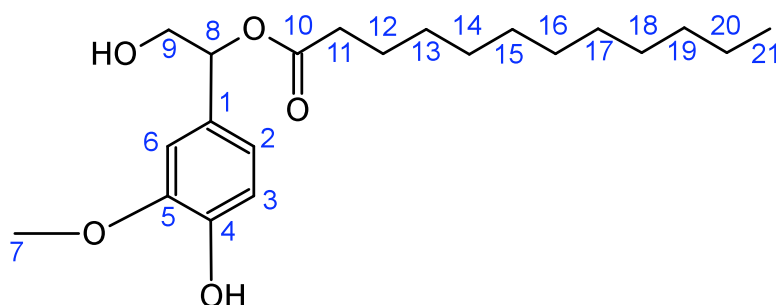
δ = 6.86 (dd, J = 8.20, 1.80 Hz, 1H, H2), 6.89 (d, J = 8.10 Hz, 1H, H3), 6.94 (s, 1H, H6), 3.91(s, 3H, H7), 4.89 (dd, J = 8.50, 3.40 Hz, 1H, H8), 4.16 (dd, J = 11.50, 8.50 Hz, 1H, H9), 4.25 (dd, J = 11.60, 3.40 Hz, 1H, H9), 2.36 (t, J = 7.50 Hz, 2H, H11), 1.64 (m, 2H, H12), 1.27-1.31 (m, 12H, H13-H18), 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H19), 5.64 (s, 1H, OH aliphatique) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):

δ = 131.8 (C1), 119.2 (C2), 114.3 (C3), 145.6 (C4), 146.7 (C5), 108.6 (C6), 56.0 (C7), 72.3 (C8), 69.2 (C9), 174.0 (C10), 34.2 (C11), 25.0 (C12), 29.4 (C13), 29.1 (C14), 29.2 (2C, C15-C16), 22.6 (C17), 31.8 (C18), 14.0 (C19) ppm. C₁₉H₃₀O₅ calcd. C 67.43, H 8.93 ; found. C 67.58, H 8.77.

2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethyl dodecanoate 5f.

Rendement: 77% (0.76 mmoles).

**RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃):

δ = 6.86 (d, J = 8.46 Hz, 1H, H2), 6.89 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H3), 6.91 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, H7), 5.78 (dd, J = 7.5, 4.3 Hz, 1H, H8), 3.80 (dd, J = 11.90, 4.30 Hz, 1H, H9),

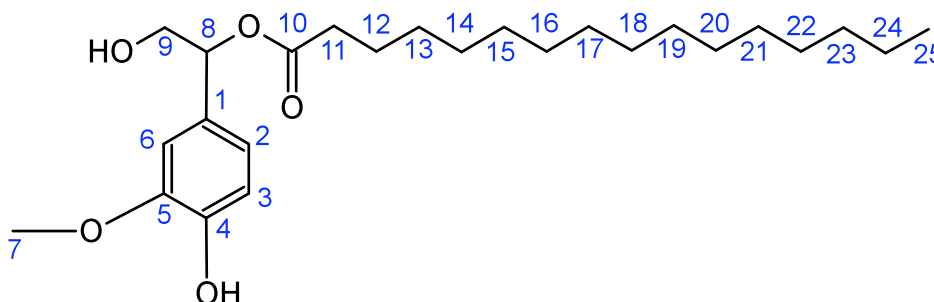
3.88 (m, 1H, H₉), 2.38 (t, J = 7.3 Hz, 2H, H₁₁), 1.62-1.65 (m, 2H, H₁₂), 1.25-1.1.30 (m, 16H, H₁₃-H₂₀), 0.89 (t, J = 6.9 Hz, 3H, H₂₁), 5.66 (s, 1H, OH aliphatique) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):

δ = 129.0 (C₁), 119.8 (C₂), 114.5 (C₃), 145.8 (C₄), 146.5 (C₅), 109.5 (C₆), 55.9 (C₇), 76.5 (C₈), 66.0 (C₉), 173.5 (C₁₀), 34.5 (C₁₁), 25.0 (C₁₂), 29.3-29.6 (C₁₃-C₁₈), 22.6 (C₁₉), 31.9 (C₂₀), 14.0 (C₂₁) ppm. C₂₁H₃₄O₅ calcd. C 68.82, H 9.35 ; found. C 68.95, H 9.28.

2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)ethyl palmitate 5g.

Rendement: 68% (0.67 mmoles).



RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃):

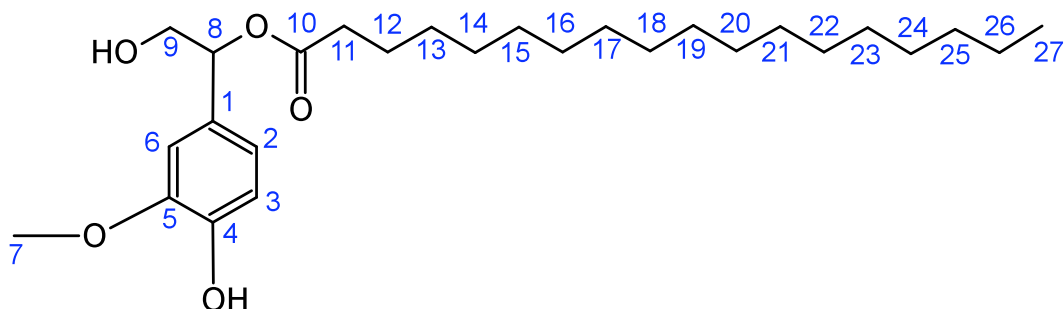
δ = 6.86 (d, J = 8.46 Hz, 1H, H₂), 6.88 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H₃), 6.92 (s, 1H, H₆), 3.90 (s, 3H, H₇), 5.78 (dd, J = 7.6, 4.3 Hz, 1H, H₈), 3.81 (dd, J = 11.90, 4.30 Hz, 1H, H₉), 3.88 (m, 1H, H₉), 2.38 (t, J = 8.1 Hz, 2H, H₁₁), 1.62-1.65 (m, 2H, H₁₂), 1.25-1.1.26 (m, 24H, H₁₃-H₂₄), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H₂₅), 5.66 (s, 1H, OH aliphatique) ppm.

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃):

δ = 129.0 (C₁), 119.8 (C₂), 114.5 (C₃), 145.8 (C₄), 146.5 (C₅), 109.5 (C₆), 55.9 (C₇), 76.5 (C₈), 66.0 (C₉), 173.5 (C₁₀), 34.5 (C₁₁), 25.0 (C₁₂), 29.0-31.9 (C₁₃-C₂₃), 22.7 (C₂₄), 14.1 (C₂₅) ppm. C₂₅H₄₂O₅ calcd. C 71.05, H 10.02 ; found. C 70.97, H 10.11.

2-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl)ethyl stearate 5h.

Rendement: 72% (0.71 mmoles).



RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3):

δ = 6.86 (d, J = 8.46 Hz, 1H, H2), 6.88 (d, J = 7.80 Hz, 1H, H3), 6.92 (s, 1H, H6), 3.90 (s, 3H, H7), 5.79 (dd, J = 7.6, 4.3 Hz, 1H, H8), 3.81 (dd, J = 11.90, 4.30 Hz, 1H, H9), 3.88 (m, 1H, H9), 2.38 (t, J = 7.7 Hz, 2H, H11), 1.62-1.65 (m, 2H, H12), 1.26 (m, 28H, H13-H26), 0.89 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H27), 5.69 (s, 1H, OH aliphatique) ppm.

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3):

δ = 129.0 (C1), 119.7 (C2), 114.5 (C3), 145.8 (C4), 146.5 (C5), 109.5 (C6), 55.9 (C7), 76.5 (C8), 66.0 (C9), 173.5 (C10), 34.5 (C11), 25.0 (C12), 29.0-31.9 (C13-C25), 22.7 (C26), 14.1 (C27) ppm. $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_5$ calcd. C 71.96, H 10.29 ; found. C 71.84, H 10.34.

Tous les produits purs ont été analysés en RMN (section II.5, chapitre 2) et stockés sous atmosphère inerte à -80°C .

V.4 EVALUATION DE LA CAPACITE ANTIOXYDANTE DES PRODUITS DE LIPOPHILISATION PAR LE TEST CAT (CONJUGATED AUTOXIDIZABLE TRIENE ASSAY)

Cette méthode en milieu hétérogène, est fondée sur la forte sensibilité à l'oxydation de l'acide α -éleostéarique naturellement présent dans les triacylglycérols de l'huile de bois de Chine (*Aleurites fordii*, huile de tung) Laguerre *et al.* (2008). En conditions non oxydantes, le système triénique de l'acide α -éleostéarique, présente un fort signal trifide dans le domaine de l'UV avec un maximum à 273 nm. Suite à

l'oxydation, initié par l'azo-initiateur 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH, Figure 22), la dégradation du triène conjugué en un système diénique, est accompagnée d'une diminution du signal. En conséquence, un suivi spectrométrique, en présence et absence d'antioxydant, conduit à une détermination directe de la capacité d'une molécule à protéger cette huile de l'oxydation.

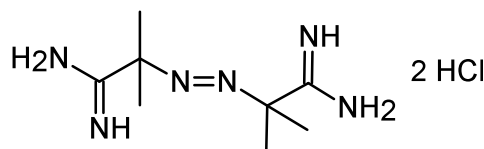


Figure 22. Structure chimique du 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochlorhydrique (AAPH).

Purification de l'huile de tung (élimination des tocophérols)

Les composés polaires de l'huile de tung, ainsi que les tocophérols sont préalablement éliminés de l'huile par chromatographie sur colonne d'alumine en utilisant l'hexane comme solvant d'élution. Le système de séparation est préparé comme suit : dans une colonne de verre ($\varphi = 30$ mm et hauteur = 40 cm), 25 g d'alumine sont introduits à l'aide de la phase mobile (*n*-hexane). Quand les particules d'alumine en suspension sont complètement décantées, l'excès d'hexane est retiré et 25 mL d'une solution d'huile à 200 mg.mL^{-1} dans l'hexane sont élués dans la colonne. La solution hexanique obtenue après le procédé de séparation est aussitôt évaporée sous vide (40mmHg) à l'évaporateur rotatif, à une température de 35°C . Les étapes de séparation et d'évaporation sont effectuées à l'abri de la lumière, afin de prévenir l'oxydation de l'huile. Enfin, ces échantillons sont inertés à l'azote et conservés à -18°C jusqu'à leur utilisation.

Préparation des solutions des composés phénoliques et des molécules lipophilisées

Des solutions fraîches de Trolox et de chaque molécule testée, à des concentrations allant de $0,4$ à $4,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, sont préparées dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1) (v/v), puis diluées dans du méthanol de façon à obtenir une gamme de concentration de 0.1 à $1.0 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, et stockées dans des flacons ambrés.

Lecture en microplaques

Cinquante microlitres des solutions préparées précédemment sont transférés dans une microplaque à 96 puits (Greiner, Frickenhausen, Allemagne) qui est ensuite préchauffée à 37°C et agitée dans un agitateur thermostatique (PHMT Grant Instruments Ltd., Shepreth, Angleterre) pendant 5 min à 1200 rpm. Vingt-cinq millilitres de PBS contenant du Brij 35 (34 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) sont ajoutés à 5 mg d'huile de tung purifiée dans un flacon en verre ambré. Par la suite, ce mélange est vortexé pendant 10 secondes avant homogénéisation dans un homogénéisateur Ultra Turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Allemagne) à 2400 rpm pendant 90 secondes. Chaque puits de la microplaque est ensuite complété avec 100 μL de cette émulsion. Pour améliorer la répétabilité, la microplaque est immédiatement préchauffée et maintenue sous agitation dans un agitateur thermostatique (PHMT Grant Instruments Ltd.) à 37°C pendant 1 min à 1200 rpm. Cinquante microlitres d'une solution d'AAPH dans du PBS (4 mmol.L^{-1}), préparée immédiatement avant la lecture, sont ajoutés dans les puits. Enfin, chaque puits contient un volume final de 200 μL , avec 115 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ d'huile de tung, 17 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Brij 35, 1 mmol.L^{-1} d'AAPH et les composés antioxydants à différentes concentrations (0.25 à 1.0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). La cinétique de la réaction est immédiatement suivie en mesurant la décroissance de l'absorbance à 273 nm. Les mesures sont prises chaque minute pendant 6 heures à $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ avec 5 secondes d'agitation de la plaque avant chaque lecture, en utilisant un lecteur de microplaques modèle M1000 (Tecan, Groedig, Autriche) équipé du logiciel Magellan. Toutes les mesures sont effectuées en triple exemplaire et reportées comme moyenne \pm écart type. Par la suite, le signal brut d'absorbance est transformé en absorbance relative grâce à l'équation suivante :

$$\text{Absorbance relative} = \frac{A_t}{A_0}$$

où A_t et A_0 sont les absorbances lues à l'instant t (min) et 0 (min), respectivement. L'aire sous la courbe (ASC) correspondant à la décroissance de l'absorbance relative à 273 nm est calculée selon la formule suivante:

$$ASC = 1 + \frac{A1}{A0} + \frac{A2}{A0} + \dots + \frac{A359}{A0} + \frac{A360}{A0}$$

L'aire sous la courbe fournie par un échantillon d'antioxydant est ensuite calculée en utilisant la différence entre l'ASC en présence d'un antioxydant (ASC échantillon) et le blanc (ASC blanc) correspondant à une solution sans antioxydant. Le Trolox est utilisé comme étalon interne. Ainsi, la capacité antioxydante (valeur CAT) d'un échantillon est donnée en équivalent Trolox et calculée par l'équation suivante:

$$\text{Valeur CAT} = \frac{(\text{ASC échantillon} - \text{ASC blanc})}{(\text{ASC Trolox} - \text{ASC blanc})} \times \frac{(\text{moles de Trolox})}{(\text{moles d'échantillon})}$$

Où (ASC échantillon – ASC blanc) et (ASC Trolox – ASC blanc) sont les zones du graphique qui représentent respectivement les protections nettes en présence d'antioxydant et en présence de Trolox. La valeur CAT est exprimée en moles du composé testé par moles de Trolox, à savoir en équivalent Trolox (Figure 23).

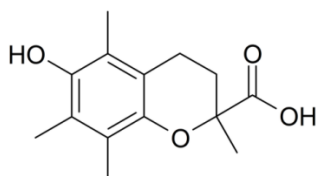


Figure 23. Structure chimique du Trolox.

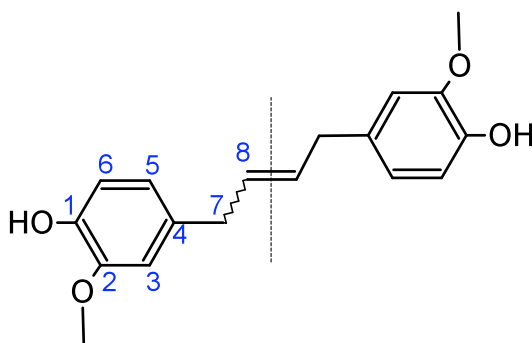
VI. REACTIONS DE METATHESE

VI.1 DIMERISATION DE L'EUGENOL **8** PAR METATHESE CROISEE

Dans un ballon à fond rond, sous agitation (200 rpm) magnétique et à reflux, 1 mmole (0.16 g) d'eugénol **8** est solubilisée dans 5 mL de dichlorométhane en présence de 5% (en moles) de catalyseur de Grubbs II ($C_{46}H_{65}Cl_2N_2PRu$). Le suivi de la réaction est réalisé par chromatographie sur couche mince (section II.1, chapitre 2). A la fin de cette dernière, le milieu réactionnel est ensuite concentré par évaporation sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie FLASH (section II.2, chapitre 2) en utilisant comme éluant un mélange éther de pétrole (A)/acétate d'éthyle (B) et le gradient d'élution suivant : 10% de B (0-10 min), 10 - 90% de B (10 - 35 min), 90 - 100% de B (35 - 50 min).

(*E*)-4,4'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(2-méthoxyphénol) **8a**:

Rendement : 15% (0,75 mmole).



RMN 1H (500 MHz, $DMSO-d_6$):

δ = 7.23 (s, 1H, H3), 6.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H5), 6.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H6), 3.22 (d, J = 11.4, 2.7 Hz, 1H, H7), 5.60 (s, 1H, H8), 3.72 (s, 3H, Me), 8.69 (s, 1H, OH) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, $DMSO-d_6$):

δ = 144.60 (C1), 147.42 (C2), 112.51 (C3), 131.3 (C4), 120.36 (C5), 115.34 (C6), 37.7 (C7), 130.27 (C8), 55.47 (Me) ppm.

VI.2 PROTECTION DE L'HYDROXYLE PHENOLIQUE DU 4-VINYLGUAIACOL 2 PAR O-METHYLATION ET DIMERISATION DU PRODUIT OBTENU

VI.2.1 Méthylation du 4-vinylguaiaicol

Le groupement hydroxyle phénolique de 1 mmole du 4-vinylguaiaicol est méthylé par étherification avec 2 mmoles d'iodométhane en présence de 2 mmoles de carbonate de potassium dans 15 mL d'acétone à 40°C et sous agitation (200 rpm) pendant 6 heures.

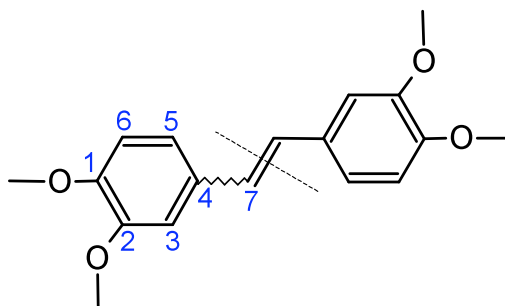
Traitement de la réaction : 20 mL d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel qui est extrait avec 3 x 20 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique (60 mL) est lavée avec 30 mL de solution saturée de NaCl, séchée avec du MgSO₄ anhydre, filtrée et le solvant évaporé sous vide. Le produit brut est soumis à une réaction de métathèse comme décrit ensuite.

VI.2.2 Réaction de métathèse du 4-vinylguaiaicol méthylé 7

Dans un ballon à fond rond, sous agitation (200 rpm) magnétique et à reflux, le produit brut obtenu à l'étape précédente (0.35 g, 2.13 mmol) est solubilisée dans 5 mL de dichlorométhane en présence de 5% (en moles) de catalyseur de Grubbs II (C₄₆H₆₅Cl₂N₂PRu) sous atmosphère d'argon et le mélange chauffé à 45°C pendant 48 heures. Le suivi de la réaction est réalisé par chromatographie sur couche mince (section II.1, chapitre 2). A la fin de cette dernière, le milieu réactionnel est ensuite concentré par évaporation sous vide. Le produit brut est purifié par chromatographie FLASH (section II.2, chapitre 2) en utilisant comme éluant un mélange éther de pétrole (A)/acétate d'éthyle (B) et le gradient d'élution suivant : 10% de B (0-10 min), 10 - 90% de B (10 - 35 min), 90 - 100% de B (35 - 50 min).

1,2-bis(3,4-dimethoxyphenyl)ethane) 7a:

Rendement: 80% (0.85 mmoles)

**RMN ^1H** (500 MHz, DMSO- d_6):

δ = 7.20 (s, 1H, H3), 7.05-7.07 (m, 2H, H5 and H7), 6.92 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H6), 3.76 (s, 3H, Me), 3.82 (s, 3H, Me) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 148.1 (C1), 148.7 (C2), 108.7 (C3), 130.0 (C4), 119.1 (C5), 111.6 (C6), 126.0 (C7), 55.2 (2C, Me) ppm. $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_4$ calcd. C 71.98, H 6.71 ; found. C 71.73, H 6.44.

VI.3 GLYCIDYLATION DU CANOLOL 1, DU 4-VINYLGUAIACOL 2, ET DE L'EUGENOL 8

Dans un ballon de 50 mL, sont agités 1 mmole de composé phénolique, 0.05 mmoles de chlorure de benzyltriéthylammonium (BnEt_3NCl) et 5 mmoles d'épichlorhydrine pendant 60 minutes dans un bain d'huile à 100°C. Après refroidissement du milieu à 30°C, la même quantité de catalyseur (0.05 mmole) et 2 équivalents molaires (2 mmoles) d'une solution de NaOH (20%, m/v) sont ajoutés et le mélange réactionnel est maintenu pendant 90 minutes à cette température.

Cinquante millilitres d'eau sont ajoutés au milieu réactionnel et le milieu est extrait avec 3 x 50 mL d'acétate d'éthyle. Les phases organiques réunies sont séchées sur du MgSO_4 anhydre et le solvant est évaporé sous vide.

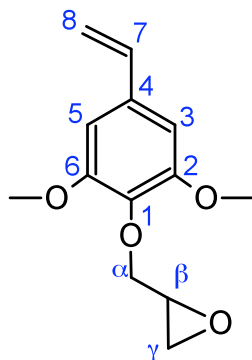
Le produit brut a été purifié par chromatographie FLASH (section II.2, chapitre 2) en utilisant comme éluant le mélange de éther de pétrole (A)/acétate d'éthyle (B) et le gradient d'élution suivant : 30% de B (0-10 min), 30 - 40% B (10 - 15 min), 40 - 60%

de B (20 – 30 min), 60 – 70% de B (35 - 50 min). Les fractions obtenues sont analysées par spectroscopie de masse (section II.4, chapitre 2).

Les produits de glycidylation obtenus sont les suivants :

2-((2,6-diméthoxy-4-vinylphénoxy)méthyl)oxirane 9:

Rendement: 90% (5.0 mmole).



RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆):

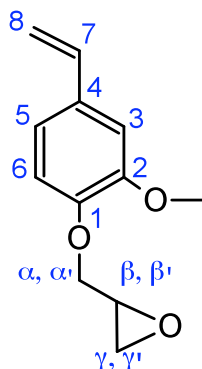
δ = 6.79 (s, 2H, H5 et H3), 6.66 (dd, J = 17.6, 11.0 Hz, 1H, H7), 5.21 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H8), 5.80 (d, J = 17.6 Hz, 1H, H8), 4.07 (dd, J = 11.5, 3.0 Hz, 1H, H α), 3.24 (dt, J = 6.8, 2.9 Hz, 1H, H β), 2.73 (m, 1H, H γ), 3.80 (s, 6H, Me) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 136.7 (C1), 153.0 (2C, C2 et C6), 103.5 (2C, C3 and C5), 133.0 (C4), 136.3 (C7), 113.7 (C8), 63.9 (C α), 50.3 (C β), 43.3 (C γ), 56.0 (Me) ppm. C₁₃H₁₆O₄ calcd. C 66.09, H 6.83 ; found. C 65.88, H 6.62.

2-((2-méthoxy-4-vinylphénoxy)méthyl)oxirane 10:

Rendement: 80% (5.32 mmole).

**RMN ¹H** (500 MHz, DMSO-*d*₆):

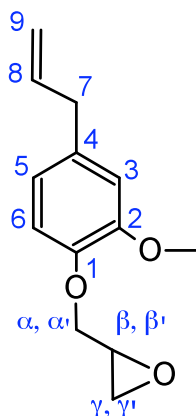
δ = 7.11 (s, 1H, H₃), 6.92 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H₅), 6.94 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H₆), 6.65 (dd, J = 17.6, 11.0 Hz, 1H, H₇), 5.13 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H₈), 5.74 (d, J = 17.6 Hz, 1H, H₈), 4.27 (dd, J = 11.3, 2.7 Hz, 1H, H _{α}), 3.78-3.82 (m, 1H, H _{α'}), 3.32 (qd, J = 6.8, 3.1 Hz, 1H, H _{β}), 2.83 (m, 1H, H _{γ}), 2.68 (dd, J = 5.0, 2.6 Hz, 1H, H _{γ'}), 3.71 (s, 3H, Me) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆):

δ = 147.7 (C₁), 149.0 (C₂), 109.3 (C₃), 130.7 (C₄), 119.1 (C₅), 113.1 (C₆), 136.4 (C₇), 112.2 (C₈), 69.8 (C _{α}), 49.7 (C _{β}), 43.8 (C _{γ}), 55.4 (Me) ppm. C₁₂H₁₄O₃ calcd. C 69.88, H 6.84 ; found. C 69.98, H 6.96.

2-((4-allyl-2-méthoxyphénoxy)méthyl)oxirane 11:

Rendement: 84% (5.12 mmoles).



RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6):

δ = 6.80 (s, 1H, H3), 6.68 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H5), 6.87 (d, J =8.1 Hz, 1H, H6), 3.29-3.30 (m, 2H, H7 et H β), 5.93 (tdd, J = 16.8, 10.0, 6.8 Hz, 1H, H8), 5.04 (dd, J = 12.5, 8.0 Hz, 2H, H9), 4.24 (dd, J = 11.3, 2.7 Hz, 1H, H α), 3.77 (m, 1H, H α'), 2.82 (m, 1H, H γ), 2.67 (dd, J = 5.1, 2.7 Hz, 1H, H γ'), 3.75 (s, 3H, Me) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 146.2 (C1), 149.1 (C2), 112.7 (C3), 133.1 (C4), 120.3 (C5), 113.9 (C6), 39.3(C7), 138.0 (C8), 115.7 (C9), 70.2 (C α), 50.0 (C β), 44.0 (C γ), 55.6 (Me) ppm. C₁₃H₁₆O₃ calcd. C 70.89, H 7.32 ; found. C 70.57, H 7.21.

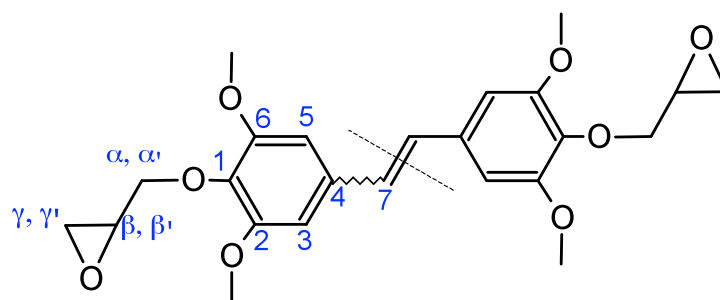
VI.4 DIMERISATION DES COMPOSES PHENOLIQUES GLYCIDYLES PAR METATHESE CROISEE

Dans un ballon à fond rond, sous agitation (200 rpm) et à reflux (45°C), 1 mmole du composé phénolique glycidylé (**9**, **10** ou **11**) est solubilisé dans 5 mL de dichlorométhane en présence de 5% (en moles) de catalyseur de Grubbs II (C₄₆H₆₅Cl₂N₂PRu). Le suivi de la réaction est fait par chromatographie sur couche mince (section II.1, chapitre 2). A la fin de la dimérisation, le mélange réactionnel est concentré par évaporation du solvant sous vide. Le produit brut a été purifié par chromatographie FLASH (section II.2, chapitre 2) en utilisant comme éluant le mélange éther de pétrole (A)/acétate d'éthyle (B) et le gradient d'élution suivant : 10% de B (0-10 min), 10 - 90% de B (10 - 35 min), 90 - 100% de B (35 - 50 min).

Les dimères **12**, **13** et **14** ont été respectivement produits par homométathèse des composés **9**, **10** et **11** respectivement.

4,4'-(ethene-1,2-diyl)bis(2,6-diméthoxyphénol) 12:

Rendement : 78% (0.39 mmole).

**RMN ^1H** (500 MHz, DMSO- d_6):

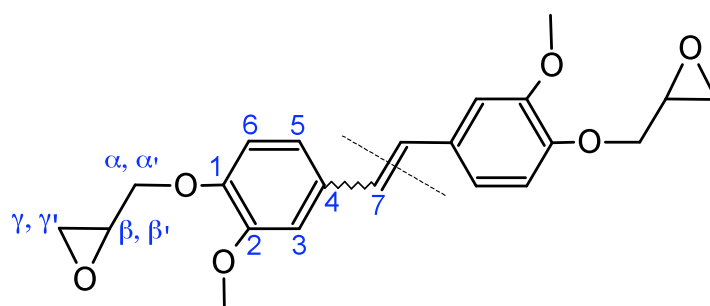
δ = 6.92 (s, 2H, H3 et H5), 7.18 (s, 1H, H7), 4.10 (dd, J = 11.5, 2.9 Hz, 1H, $\text{H}\alpha$), 3.76 (dd, J = 11.5, 6.5 Hz, 1H, $\text{H}\alpha'$), 3.25 (dt, J = 6.8, 2.9 Hz, 1H, $\text{H}\beta$), 2.75 (m, 1H, $\text{H}\gamma$), 2.58 (dd, J = 5.0, 2.7 Hz, 1H, $\text{H}\gamma'$), 3.84 (s, 6H, Me) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 136.0 (C1), 153.0 (C2), 103.6 (2C, C3 et C5), 133.0 (C4), 152 (C5), 127.9 (C7), 74.0 ($\text{C}\alpha$), 50.3 ($\text{C}\beta$), 43.3 ($\text{C}\gamma$), 55.9 (Me) ppm. $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_8$ calcd. C 64.85, H 6.35 ; found. C 65.06, H 6.19.

4,4'-(ethene-1,2-diyl)bis(2-méthoxyphénol) 13:

Rendement: 10% (0.05 mmole).

**RMN ^1H** (500 MHz, DMSO- d_6):

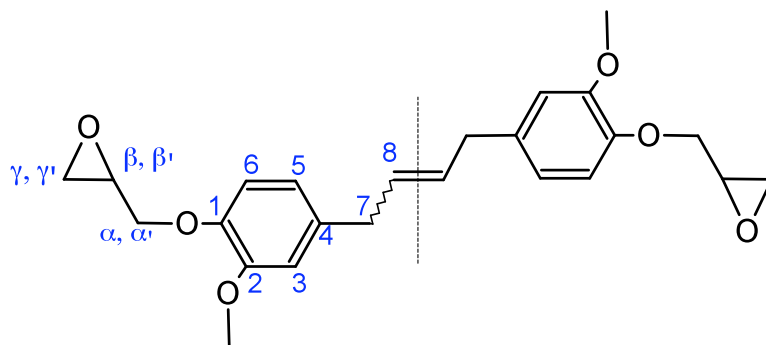
δ = 7.23 (s, 1H, H3), 7.05 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H5), 6.95 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H6), 7.08 (s, 1H, H7), 4.30 (dd, J = 11.4, 2.7 Hz, 1H, $\text{H}\alpha$), 3.82 (dd, J = 10.0, 5.1 Hz, 1H, $\text{H}\alpha'$), 3.34 (m, 1H, $\text{H}\beta$), 2.85 (m, 1H, $\text{H}\gamma$), 2.70 (dd, J = 5.0, 2.6 Hz, 1H, $\text{H}\gamma'$), 3.84 (s, 3H, Me), ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 146.7 (C1), 148.6 (C2), 109.0 (C3), 130.3 (C4), 118.8 (C5), 112.7 (C6), 125.8 (C7), 69.3 (C α), 49.3 (C β), 43.0 (C γ), 54.9 (Me) ppm. C₂₂H₂₄O₆ calcd. C 68.74, H 6.29 ; found. C 67.98, H 5.88.

4,4'-(but-2-ene-1,4-diyl)bis(2-méthoxyphénol) **14:**

Rendement: 56% (0.28 mmole).



RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6):

δ = 6.79 (s, 1H, H3), 6.66 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H5), 6.86 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H6), 3.26 (d, J = 4.8 Hz, 2H, H7), 5.63 (t, J = 3.8 Hz, 1H, H8), 4.23 (dd, J = 11.4, 2.7 Hz, 1H, H α), 3.76 (dd, J = 11.0, 6.4 Hz, 1H, H α'), 3.30 (td, J = 9.4, 4.8 Hz, 1H, H β), 2.82 (m, 1H, H γ), 2.67 (dd, J = 5.1, 2.7 Hz, 1H, H γ'), 3.73 (s, 3H, Me) ppm.

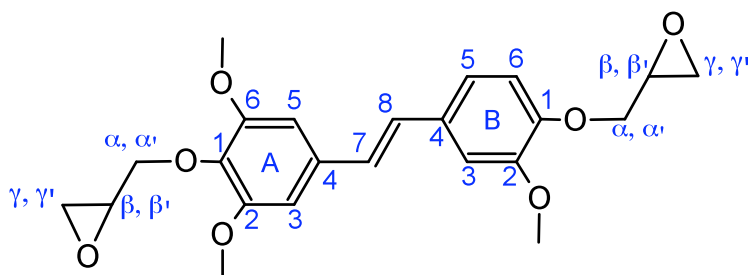
RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 146.1 (C1), 149.1 (C2), 112.6 (C3), 133.9 (C4), 120.2 (C5), 114.0 (C6), 37.8 (C7), 130.4 (C8), 70.2 (C α), 50.0 (C β), 43.9 (C γ), 55.5 (Me) ppm. C₂₄H₂₈O₆ calcd. C 69.88, H 6.84 ; found. C 69.12, H 6.32.

La métathèse croisée des composés **9** et **10** ; **9** et **11** ; **10** et **11** a donné lieu aux hétérodimères **15**, **16** et **17** respectivement.

2-((2,6-diméthoxy-4-(3-méthoxy-4-(oxiran-2-ylméthoxy)styryl)phénoxy)méthyl)oxirane 15:

Rendement: 5% (0.012 mmole).



RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6):

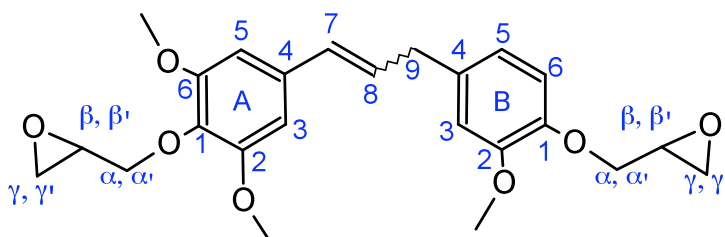
δ = 6.90 (s, 2H, H_{3A} et H_{5A}), 3.83 (s, 6H, Me_A), 4.10 (dd, J = 11.6, 3.0 Hz, 1H, H α_A), 3.75 (dd, J = 11.5, 6.5 Hz, 1H, H α'_A), 3.25 (m, 1H, H β_A), 2.74 (m, 1H, H γ_A), 2.57 (dd, J = 5.0, 2.6 Hz, 1H, H γ'_A), 7.10 (d, J = 16.3 Hz, 2H, H₇ et H₈), 7.24 (s, 1H, H_{3B}), 7.07 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H_{5B}), 6.96 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_{6B}), 3.82 (m, 1H, H α'_B), 4.30 (dd, J = 11.4, 2.7 Hz, 1H, H α_B), 3.34 (m, 1H, H β_B), 2.70 (dd, J = 5.0, 2.6 Hz, 1H, H γ'_B), 2.84 (m, 1H, H γ_B), 3.85 (s, 3H, Me_B) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 135.4 (C_{1A}), 152.6 (2C, C_{2A} et C_{6A}), 103.1 (2C, C_{3A} and C_{5A}), 132.8 (C_{4A}), 50.0 (C β_A), 43.0 (C γ_A), 55.5 (2C, Me_A), 126.1 (C₇), 127.5 (C₈), 147.1 (C_{1B}), 148.3 (C_{2B}), 108.9 (C_{3B}), 130.3 (C_{4B}), 119.2 (C_{5B}), 112.9 (C_{6B}), 55.1 (Me_B), 69.6 (C α_B), 73.6 (C α_B), 49.3 (C β_B), 43.5 (C γ_B) ppm. C₂₃H₂₆O₇ calcd. C 66.65, H 6.32 ; found. C 67.02, H 6.63.

((2,6-diméthoxy-4-(3-(3-méthoxy-4-(oxiran-2-ylméthoxy)phényl)prop-1-enyl)phénoxy)méthyl)oxirane 16:

Rendement: 48% (0.12 mmole).



RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6):

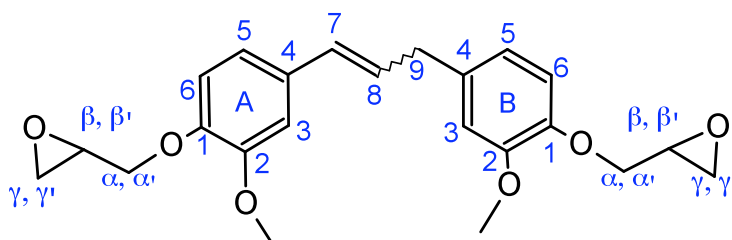
δ = 6.71 (s, 2H, H_{3A} and H_{5A}), 4.24 (dd, J = 11.3, 2.5 Hz, 1H, H α' A), 3.30 (m, 1H, H β A), 2.82 (m, 1H, H γ A), 2.67 (dd, J = 5.0, 2.6 Hz, 1H, H γ' A), 6.38 (s, 2H, H7 and H8), 3.44 (d, J = 5.1 Hz, 2H, H9), 6.86 (s, 1H, H_{3B}), 6.73 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{5B}), 6.90 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{6B}), 4.05 (dd, J = 11.4, 3.0 Hz, 1H, H α B), 3.71 (dd, 2H, H α' B), 3.23 (m, 1H, H β B), 2.55 (dd, J = 5.2, 2.7 Hz, 1H, H γ' B), 2.72 (m, 1H, H γ B), 3.76 (s, 3H, Me), 3.77 (s, 6H, Me) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 145.2 (C_{1A}), 152.4 (2C, C_{2A} et C_{6A}), 103.0 (2C, C_{3A} and C_{5A}), 132.7 (C_{4A}), 73.4 (C α _A), 49.4 (C β _A), 42.8 (C γ _A), 55.3 (2C, Me_A), 129.8 (C7), 128.7 (C8), 37.8 (C9), 145.7, (C_{1B}), 148.5 (C_{2B}), 112.4 (C_{3B}), 132.8 (C_{4B}), 120.0 (C_{5B}), 113.2 (C_{6B}), 69.5 (C α _B), 49.7 (C β _B), 43.2 (C γ _B), 55.3 (Me_B) ppm. C₂₄H₂₈O₇ calcd. C 67.28, H 6.59 ; found. C 66.90, H 6.28.

2,2'-(4,4'-(prop-1-ene-1,3-diyl)bis(2-méthoxy-4,1-phenylene))bis(oxy)bis(methylene)dioxirane 17:

Rendement : 14% (0.07 mmole).

**RMN ^1H** (500 MHz, DMSO- d_6):

δ = 7.05 (s, 1H, H_{3A}), 6.87-6.91 (m, 4H, H_{5A}, H_{6A}, H_{6B} and H_{3B}), 6.37 (d, J = 15.8 Hz, 1H, H7), 6.31 (m, 1H, H8), 3.43 (d, J = 6.4 Hz, 2H, H9), 6.74 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H_{5B}), 4.26 (dd, J = 11.0, 2.7 Hz, 1H, H α), 3.75 (m, 2H, H α'), 3.32 (m, 2H, H β), 2.67 (m, 2H, H γ'), 2.83 (m, 1H, H γ), 3.77 (s, 3H, Me), 3.78 (s, 3H, Me) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 146.8 (C_{1A}), 148.8 (C_{2A}), 108.9 (C_{3A}), 133.2 (2C, C_{4A} et C_{4B}), 118.6 (C_{5A}), 113.0 (C_{6A}), 129.5 (C7), 127.5 (C8), 38.0 (C9), 69.5 (2C, C α), 49.5 (2C, C β), 43.5 (2C, C γ),

55.2 (2C, Me), 145.8 (C1_B), 148.7 (C2_B), 112.2 (C3_B), 120.0 (C5_B), 113.4 (C6_B), ppm.
 C₂₃H₂₆O₆ calcd. C 69.33, H 6.58 ; found. C 69.08, H 6.13.

VII. DIMERISATION DE L'EUGENOL PAR O-ALKYLATION ET EPOXYDATION DES DOUBLES LIAISONS ALLYLIQUES

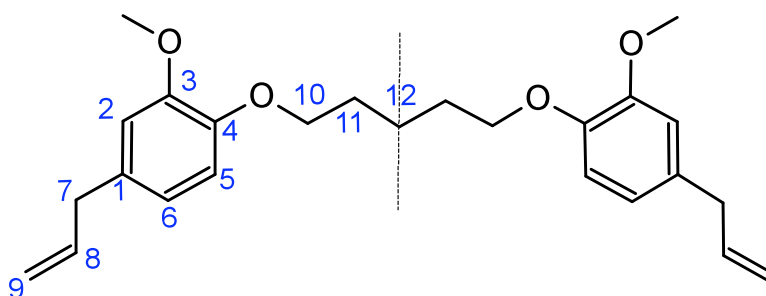
VII.1 DIMERISATION DE L'EUGENOL PAR O-ALKYLATION AVEC LE 1,5-DIBROMOPENTANE

Dans un bain de glace, 3 mmoles d'eugénol et 1.85 mmoles de carbonate de potassium sont dissoutes dans un ballon de 50 mL contenant 5 mL de DMF. Après 5 minutes d'agitation, 0.74 mmoles de 1,5-dibromopentane sont ajoutées lentement au milieu réactionnel. La solution est maintenue sous agitation (200 rpm) pendant 30 min. La réaction est maintenue à 25°C pendant 48 heures.

Trente millilitres d'eau sont ensuite ajoutés et la solution aqueuse est extraite avec 3 x 30 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec 50 mL de saumure puis séchée sur MgSO₄ anhydre et concentrée sous vide. Le produit brut a été purifié par chromatographie FLASH (section II.2, chapitre 2) en utilisant comme éluant un mélange d'éther de pétrole (A)/acétate d'éthyle (B) et le gradient d'élution suivant : 20% de B (0-10 min), 20 - 40% de B (10 - 20 min), 40 – 60% de B (20 – 30 min), 60 – 80% de B (40 - 50 min).

1,5-bis(4-allyl-2-méthoxyphénoxy)pentane 18:

Rendement: 70% (1.05 mmole).



RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6)

δ = 6.76 (s, 2H, H2), 6.84 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H5) 6.66 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H6), 3.27 (d, J = 6.7 Hz, 4H, H7), 5.92 (tdd, J = 16.8, 10.0, 6.8 Hz 2H, H8), 5.04 (dd, J = 16.8, 10.1 Hz, 4H, H9), 3.90 (t, J = 6.4 Hz, 4H, H10), 1.74 (m, 4H, H11), 1.54 (m, 2H, H12), 3.72 (s, 6H, Me) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6)

δ = 132.4 (2C, C1), 112.7 (2C, C2), 149.1 (2C, C3), 146.6 (2C, C4), 113.5 (2C, C5), 120.4 (2C, C6), 39.2 (2C, C7), 138.1 (2C, C8), 115.5 (2C, C9), 68.4 (2C, C10), 28.7 (2C, C11), 22.5 (C12), 55.6 (2C, Me) ppm. $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_4$ calcd. C 75.73, H 8.13 ; found. C 75.48, H 7.98.

Le produit **18** est soumis à l'époxydation des ses liaisons allyliques, comme décrit ci-dessous.

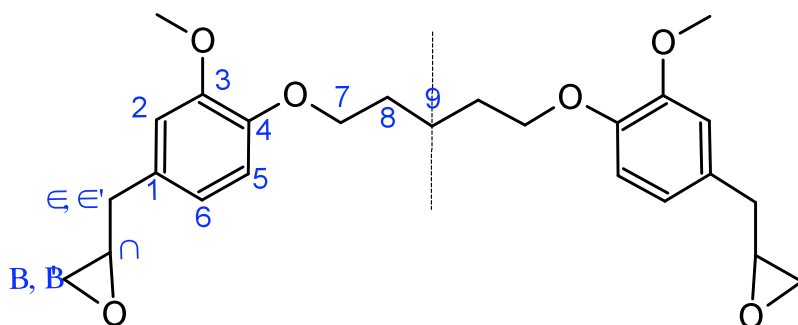
VII.2 EPOXYDATION CHIMIO-ENZYMATIQUE DES DOUBLES LIAISONS ALLYLIQUES

La réaction d'époxydation est effectuée dans un ballon bicol de 50 mL équipé d'un barreau magnétique. Tout d'abord, le dimère **18** (0.25 mmoles) et l'acide caprylique (0.5 mmoles) sont dissous dans 3 mL de toluène. Puis, la lipase B de *Candida antarctica* immobilisée (20%, m/m du dimère) est ajoutée, et le mélange est chauffé à 40°C dans un bain d'huile. Dans la seconde étape, 0.9 mmole de peroxyde d'hydrogène à 30% (m/v) est additionné au cours de 4 heures de réaction (20 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$), puis la synthèse est arrêtée après 48 heures.

Le catalyseur est éliminé du milieu réactionnel par filtration, le filtrat est lavé avec 2 x 30 mL d'eau et la phase aqueuse est extraite avec 3 x 30 mL d'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre et concentrée sous vide.

1,5-bis(2-méthoxy-4-(oxiran-2-ylméthyl)phénoxy)pentane 19:

Rendement: 78% (0.2 mmole).

**RMN ^1H** (500 MHz, DMSO- d_6):

δ = 6.87 (s, 2H, H₂), 6.88 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H₅), 6.75 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H₆), 3.93 (t, J = 6.4 Hz, 4H, H₇), 1.75 (m, 4H, H₈), 1.55 (dt, J = 15.1, 7.7 Hz, 2H, H₉), 2.67-2.75 (m, 6H, H _{γ} , H α' and H α), 3.08 (m, 2H, H β), 2.54 (dd, J = 5.1, 2.6 Hz, 2H, H γ'), 3.74 (s, 6H, Me) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6):

δ = 129.6 (C₁), 112.9 (C₂), 148.5 (C₃), 146.4 (C₄), 114.9 (C₅), 120.6 (C₆), 67.9 (C₇), 28.2 (C₈), 21.8 (C₉), 37.4 (C α), 52.1 (C β), 45.3 (C γ), 55.2 (Me) ppm. C₂₅H₃₂O₆ calcd. C 70.07, H 7.53 ; found. C 69.79, H 7.31.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

I. EFFET DES TRAITEMENTS THERMIQUES, DE L'HYDRATATION ET DU TEMPS D'INCUBATION SUR LA TENEUR EN COMPOSES PHENOLIQUES TOTAUX ET INDIVIDUELS (SINAPINE, ACIDE SINAPIQUE ET CANOLOL) DES TOURTEAUX DE COLZA

De part sa structure chimique, le canolol (2,6-diméthoxy-4-vinylphénol) constitue une molécule plate-forme potentielle pour la synthèse chimique et/ou la production de polymères. Il peut être obtenu à partir de la sinapine (sinapoyl choline), composé phénolique majoritaire du colza, après hydrolyse en acide sinapique et décarboxylation thermique ultérieure. Le premier objectif de ces travaux de thèse a donc consisté à tenter de promouvoir la formation du canolol dans les tourteaux de colza en évaluant notamment l'influence de traitements tels que l'hydratation et torréfaction, procédés potentiellement applicables ultérieurement à l'échelle industrielle. Ainsi, les paramètres étudiés pour le traitement des tourteaux ont été : i) la durée d'incubation après hydratation: 0, 2 et 18 heures et, ii) les traitements de torréfaction standard, avec (160°C) ou sans vapeur surchauffée (105°C) ou par micro-ondes avec (180°C) ou sans vapeur surchauffée (160°C).

I.1 PROCEDES INDUSTRIELS DE TRITURATION DES GRAINES DE COLZA

Les procédés industriels d'extraction de l'huile de colza utilisent ou combinent généralement des méthodes d'extraction liquides et mécaniques. Avant l'étape d'extraction de l'huile, les graines sont normalement soumises à différents procédés tels que le nettoyage, le séchage, le broyage, l'élimination de la coque, la cuisson, l'écaillage et l'extrusion. A l'exception du pressage à froid, les graines sont généralement chauffées et parfois séchées avant leur extraction. Quand la durée de torréfaction dépasse 10-15 minutes, cette étape est désignée comme «cuisson». Le conditionnement des graines facilite le transfert de chaleur de la vapeur saturée à l'oléagineux sans permettre à la vapeur d'entrer en contact avec la matière en état de

conditionnement (Figure 24). La préparation des graines est une phase critique en termes de température, de durée de torréfaction et de teneur en eau. Ces paramètres peuvent influencer sur la malléabilité et la porosité du gâteau ainsi que sur la viscosité de l'huile. En absence de solvant lors du procédé d'extraction de l'huile (pression à froid), un double pressage après l'étape de cuisson est nécessaire. Un gâteau de colza est alors obtenu par ce type de traitement avec un pourcentage d'huile résiduel de 9 à 10%. Un pressage unique fournit des gâteaux à 10-12% de matière grasse. En fonction de la capacité et de la qualité de la presse, les gâteaux provenant d'un pressage à froid possèdent 12 à 25% d'huile. A l'heure actuelle, les meilleurs rendements en huile sont obtenus par extraction à l'aide de solvant, le plus couramment utilisé à l'échelle industrielle étant le *n*-hexane. Son élimination ultérieure au sein du tourteau (desolvantisation) est une étape primordiale pour permettre son application en alimentation animale.

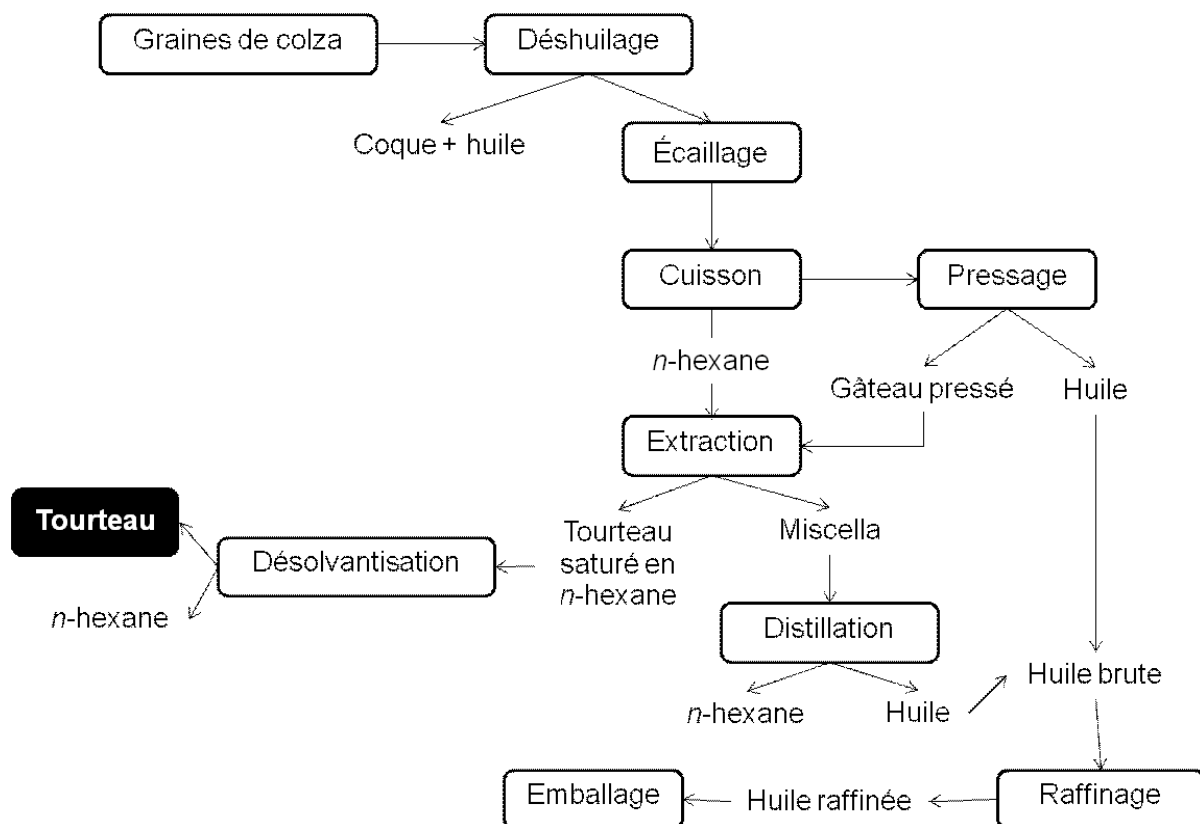


Figure 24. Processus industriel de pressage des graines de colza et production de tourteau.

Afin d'étudier l'effet des traitements thermiques, de l'hydratation et du temps d'incubation sur la teneur en composés phénoliques totaux et individuels (sinapine,

acide sinapique et canolol) des tourteaux de colza, le processus adopté pour le traitement des graines et tourteau de colza a suivi le schéma présenté à la Figure 25.

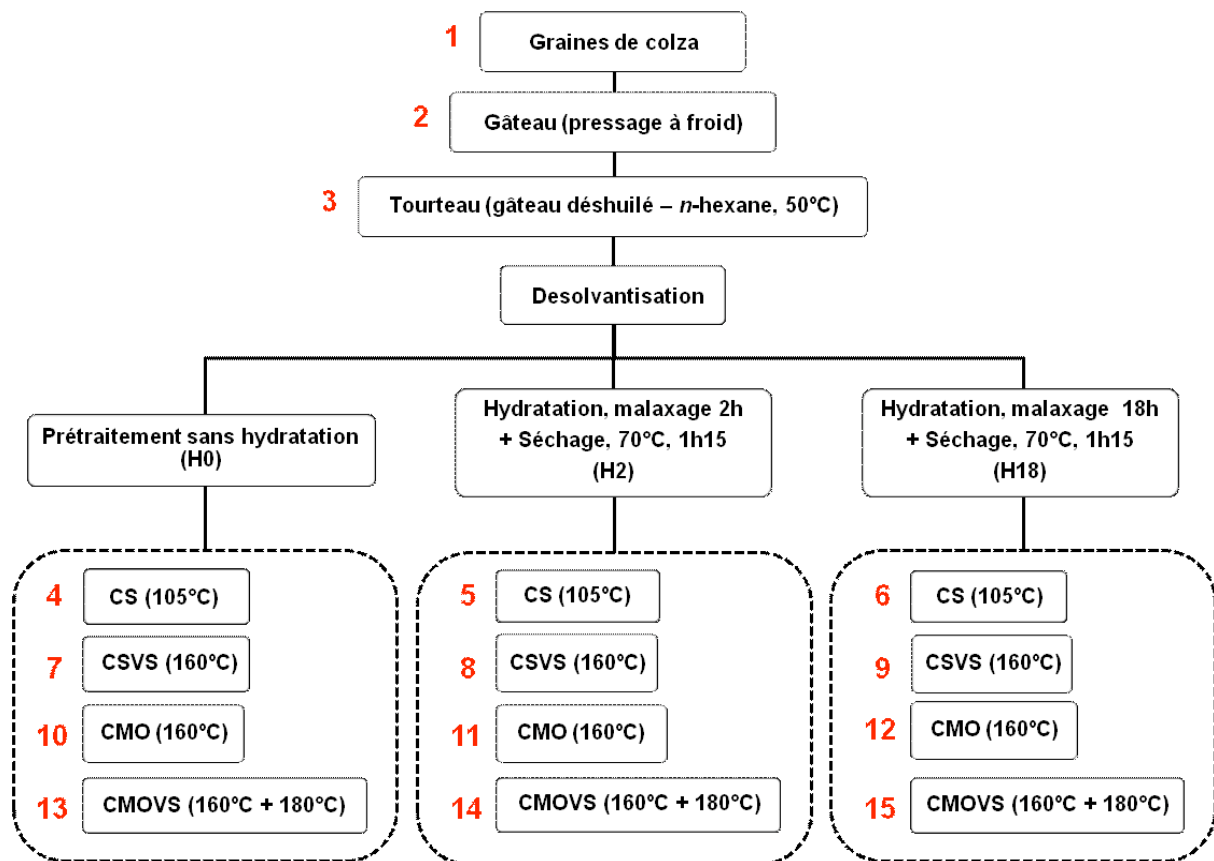


Figure 25. Schéma décrivant les différents traitements subis par les échantillons.

Les traitements des échantillons de colza sont décrits plus en détail dans la section III du chapitre 2.

I.2 CARACTERISATION DES TOURTEAUX DE COLZA

I.2.1 Teneur en eau et en huile

Les graines de colza sont généralement récoltées à environ 8-9% d'humidité pour éviter les pertes au cours de leur traitement. Dans cette étude, les graines utilisées avaient une humidité de 7.9% (Figure 26). Après broyage et déshuilage, mais sans traitement de torréfaction ni séchage, leur teneur d'eau augmente d'environ 30% en

raison de l'élimination de l'huile. Les échantillons pré-hydratés pendant 2h ou 18h, séchés dans un cabinet d'air chaud à 70°C pendant 1h15, possèdent respectivement 4.1% et 5.9% d'eau résiduelle. Après torréfaction, la teneur en eau la plus élevée était de 6.3% pour l'échantillon torréfié à 105°C sans incubation (CS-H0), diminuant à 2.7% pour celui ayant subi en plus une injection de vapeur surchauffée à 160°C pendant 47 min (CSV-S-H0). Les échantillons traités par micro-ondes, avec ou sans injection de vapeur (CMO-H0 et CMOV-S-H0), sont environ 60% moins humides que le tourteau (4.3 et 3.7%, respectivement). L'incubation du tourteau CS (cuisson standard à 105°C) pendant 2 et 18 heures a augmenté sa teneur en eau respectivement de 93% (12.2%) et 50% (9.4%) (Figure 26). Cette différence peut s'expliquer par le temps total de torréfaction. En effet, pour CS-H0 (tourteau non hydraté - cuisson standard), l'injection de vapeur a nécessité plus de temps pour atteindre la température souhaitée de 105°C par rapport aux échantillons qui ont subi un prétraitement de 2h et 18h (CS-H2 et CS-H18) (données non présentées), conduisant ainsi à une déshydratation du tourteau. Les échantillons incubés pendant 2h et 18h (CS-H2 et CS-H18), quant à eux, ont été soumis à un traitement de torréfaction plus court permettant leur réhydratation par la vapeur d'eau. Cette dernière est proportionnelle à la teneur initiale en eau déterminée à la fin de l'étape d'incubation. Pour les échantillons soumis à une cuisson standard avec une injection de vapeur surchauffée (CSV-S), plus le temps d'incubation est long, plus la teneur en eau est faible (diminution de 52% (1.3%) pour CSV-S-H2 vs. 27% (1.9%) pour CSV-S-H18). Pour les échantillons torréfiés par micro-ondes (CMO), incubés pendant 2 heures et 18 heures diminue respectivement leur teneur en eau d'environ 21% (3.4%) et 29% (3.1%) (CMO-H2 et CMO-H18). Pour les échantillons torréfiés par micro-ondes avec une injection de vapeur surchauffée (CMOV-S-H2 et CMOV-S-H18), aucune différence significative n'a été observée en ce qui concerne le temps d'hydratation. La durée d'hydratation n'a pas affecté significativement les teneurs en eau des échantillons soumis aux micro-ondes, de l'ordre de 4% après incubation de 2 ou 8 heures (Figure 26).

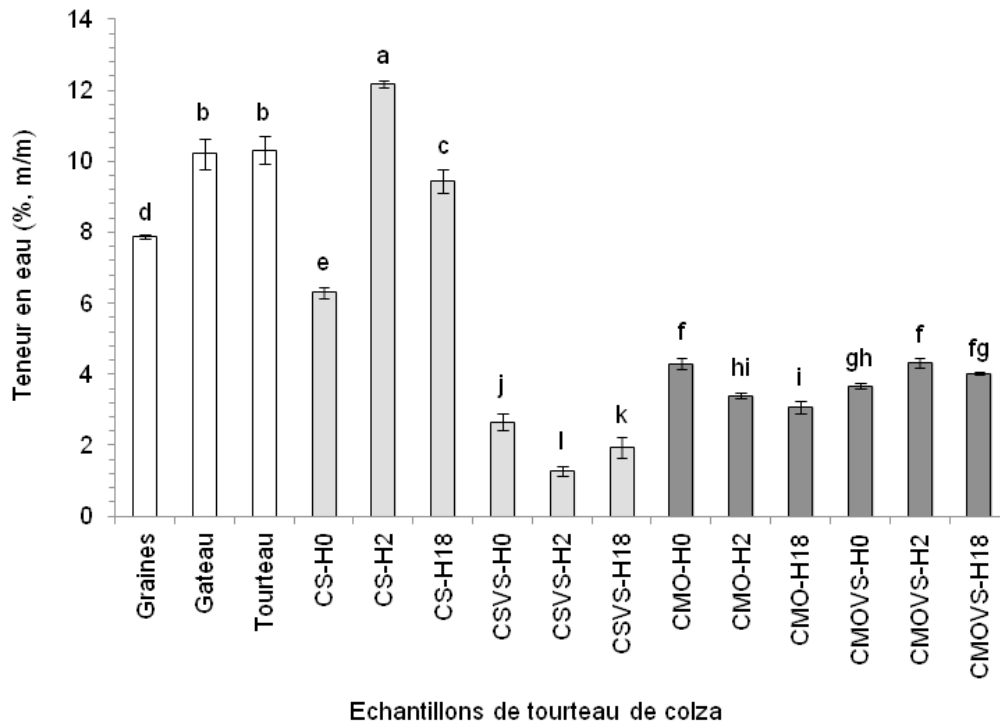


Figure 26. Teneur en eau des échantillons étudiés (% m/m). Traitements thermiques employés: (□) sans torréfaction (25°C), (■) CS (105°C) et CSVS (160°C) torréfaction conventionnelle (vapeur surchauffée); (■) CMO (160°C) et CMOVS (180°C) torréfaction par micro-ondes. Paramètres d'hydratation: H0 = pas d'hydratation, H2 = 2 heures d'incubation et H18 = 18 heures d'incubation. (Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \leq 0,05$). Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n = 3$).

Concernant la teneur en huile (Figure 27), les graines utilisées dans ces travaux de thèse avaient une teneur de 47%, valeur similaire à celles reportées dans les travaux précédents (Harbaum-Piayda *et al.*, 2010; Kuwahara *et al.*, 2004). Les étapes de pressage des graines et de délipidation du gâteau réduisent respectivement la teneur en huile de 60% (teneur en huile finale de 19.6%) et 98% (teneur en huile finale de 1.1%). Ces valeurs sont peu affectées par les procédés de torréfaction et d'hydratation (Figure 27). Selon Unger (1990), la quantité d'huile résiduelle dans le tourteau dépend essentiellement de la méthode de traitement et est généralement comprise entre 1 et 10% (m/m).

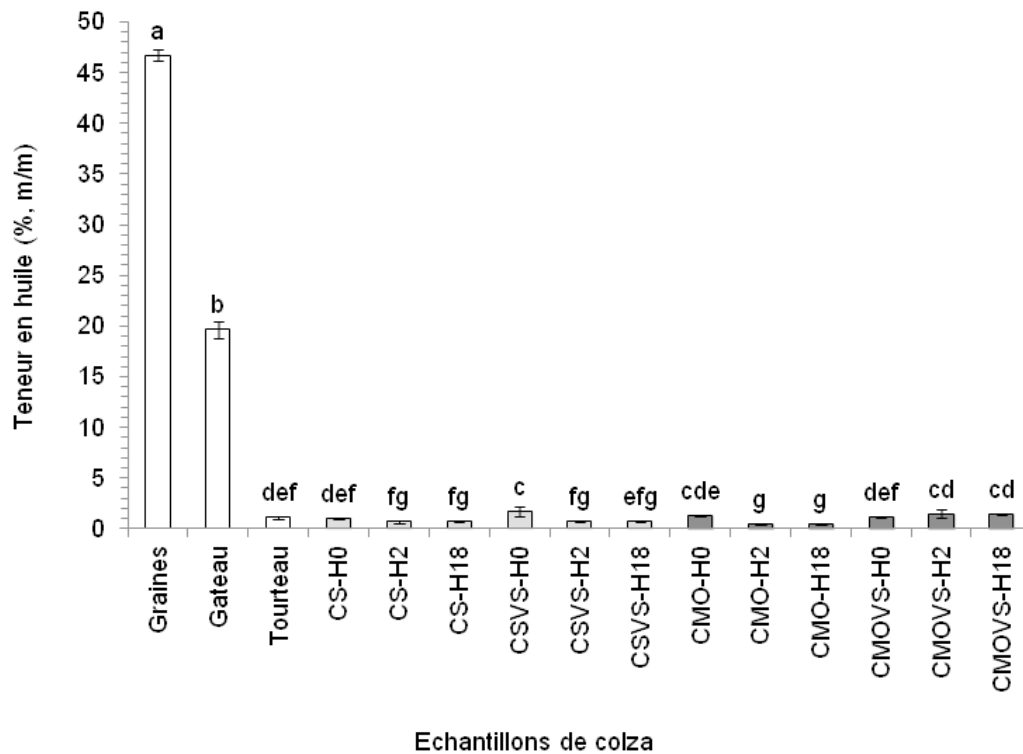


Figure 27. Teneur en huile dans les échantillons de tourteau de colza (% d'huile / grammes de matière sèche). Traitements thermiques employés: (□) sans torréfaction (25°C), (▒) CS (105°C) et CSVS (160°C) torréfaction conventionnelle (vapeur surchauffée) ; (■) CMO (160°C) et CMOVS (180°C) torréfaction par micro-ondes. Paramètres d'hydratation: H0 = pas d'hydratation, H2 = 2 heures d'incubation et H18 = 18 heures d'incubation. (Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \leq 0,05$). Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n = 3$).

1.2.2 Teneur en composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux ou TPC (*Total Phenolic Content*) a été évaluée suivant le protocole décrit en section III.2.4 du chapitre 2. Dans l'huile de colza extraite, les composés phénoliques ont été détectés seulement à l'état de traces.

Les échantillons de graines (1), de gâteau (2 - graines pressées à froid), et de tourteau (3 - gâteau délipidé) ont montré des teneurs en composés phénoliques totaux respectivement de 48.17, 73.10 et 87.77 $\mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature (Cai et Arntfield, 2001; Khattab *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014).

Afin d'évaluer l'effet des différents traitements sur les teneurs en composés phénoliques totaux, ces teneurs ont été exprimées sur base sèche des échantillons délipidés, ce qui permet de comparer les échantillons avec différents contenus en graisse résiduelle. Les résultats exprimés sur cette base conduisent à des valeurs de TPC respectivement de 90.39, 90.98 et 88.77 $\mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$ pour les graines de colza, le gâteau et le tourteau (Tableau 3, Figure 28).

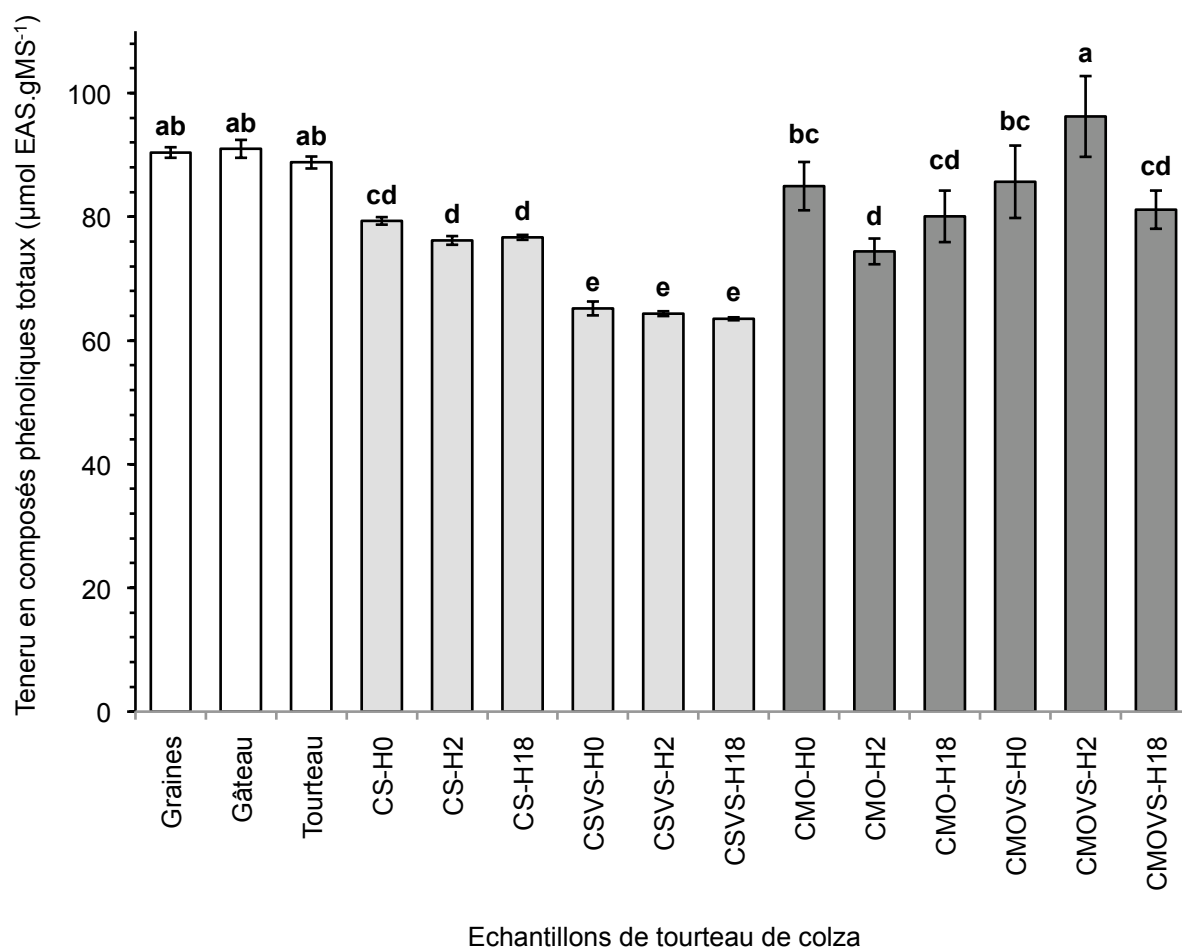


Figure 28. Composés phénoliques totaux dans les échantillons délipidés ($\mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$). Traitements thermiques employés: (□) sans torréfaction (25°C), (■) CS (105°C) et CSVS (160°C) torréfaction conventionnelle (vapeur surchauffée); (■) CMO (160°C) et CMOVS (180°C) torréfaction par micro-ondes. Paramètres d'hydratation: H0 = pas d'hydratation, H2 = 2 heures d'incubation et H18 = 18 heures d'incubation. (Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \leq 0,05$). Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n = 3$).

On peut en conclure qu'un pressage à froid des graines, suivi du déshuilage du gâteau à moins de 60°C n'affecte pas la teneur totale en composés phénoliques des matières premières.

I.2.2.1 Effet des traitements thermiques

L'influence des procédés de torréfaction sur la TPC a été décrite précédemment par différents auteurs. Par exemple, Chang *et al.* (2014) ont montré que la TPC dans l'huile extraite de graines de colza torréfiées par micro-ondes (2.45 MHz, 800 W, 7 min) a augmentée de 4.55 à 35.95 $\mu\text{mol EAS.g}^{-1}$. Cerretani *et al.* (2009) ont signalé une baisse significative de la concentration de composés phénoliques dans l'huile d'olive quand celle-ci a été exposée à un chauffage aux micro-ondes (2.45 MHz, 720 W) pendant une période de temps supérieure à 6 minutes.

Les tourteaux torréfiés par des cuissons standards à 105°C (CS-H0) et 160°C (CSV-S-H0) ont vu leur teneur en composés phénoliques totaux réduite respectivement de 11% et 27% (Tableau 2, Figure 28).

Ces résultats peuvent s'expliquer par une dégradation thermique des composés phénoliques. En revanche, les plus faibles réductions de TPC ont été mesurées pour les tourteaux traités par micro-ondes (4% de diminution à la fois pour CMO-H0 et CMOVS-H0). Ce résultat suggère que les énergies micro-ondes limitent la dégradation thermique des composés phénoliques, ou bien qu'elles libèrent plus efficacement les composés phénoliques initialement liés à des protéines ou des glucides après rupture partielle des parois des cellules végétales (Niu *et al.*, 2013).

I.2.2.2 Effet de l'hydratation et du temps d'incubation

L'effet de l'hydratation du tourteau, préalablement à la torréfaction, a été étudié pour deux périodes d'incubation (2 et 18 heures). Quelle que soit la durée de l'exposition, l'hydratation n'impacte pas significativement la TPC pour les échantillons soumis simplement à une cuisson standard (CS et CSV-S) (Tableau 3, Figure 28). Les échantillons torréfiés par micro-ondes (CMO et CMOVS) ont en revanche été

légèrement affectés par le processus d'hydratation, sans toutefois dégager de tendance claire.

Pour les échantillons uniquement torréfiés par micro-ondes (CMO), la TPC a diminué respectivement de 11% et 6% après 2 et 18 heures d'hydratation. Concernant les échantillons traités par micro-ondes avec une injection de vapeur surchauffée (CMOVS), deux heures d'hydratation (CMOVS-H2) conduisent à la plus forte TPC de tous les essais ($96.2 \mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$), ce qui correspond à 12% de plus que l'échantillon non-hydraté CMOVS-H0 ($85.7 \mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$) (Tableau 3, Figure 28). En revanche, 18 heures d'hydratation (CMOVS-H18) n'ont pas modifié significativement la TPC (81.1 vs $85.7 \mu\text{mol EAS.gMS}^{-1}$ pour CMOVS-H18 vs CMOVS-H0).

L'effet de l'hydratation sur la TPC a seulement été observé pour les tourteaux traités par micro-ondes. Bien que l'hydratation influe légèrement sur la TPC, ces données montrent que c'est le type de traitement thermique qui la modifie le plus, le traitement par micro-ondes étant le plus avantageux.

I.2.3 Teneur en composés phénoliques individuels : sinapine, acide sinapique et canolol

Comme pour la TPC, la teneur en composés phénoliques individuels a été déterminée pour les échantillons, avant et après déshuilage. Cependant, seules les valeurs obtenues pour les échantillons déshuilés ont été prises en compte pour comparer l'influence des traitements appliqués (Tableau 3, Figure 29).

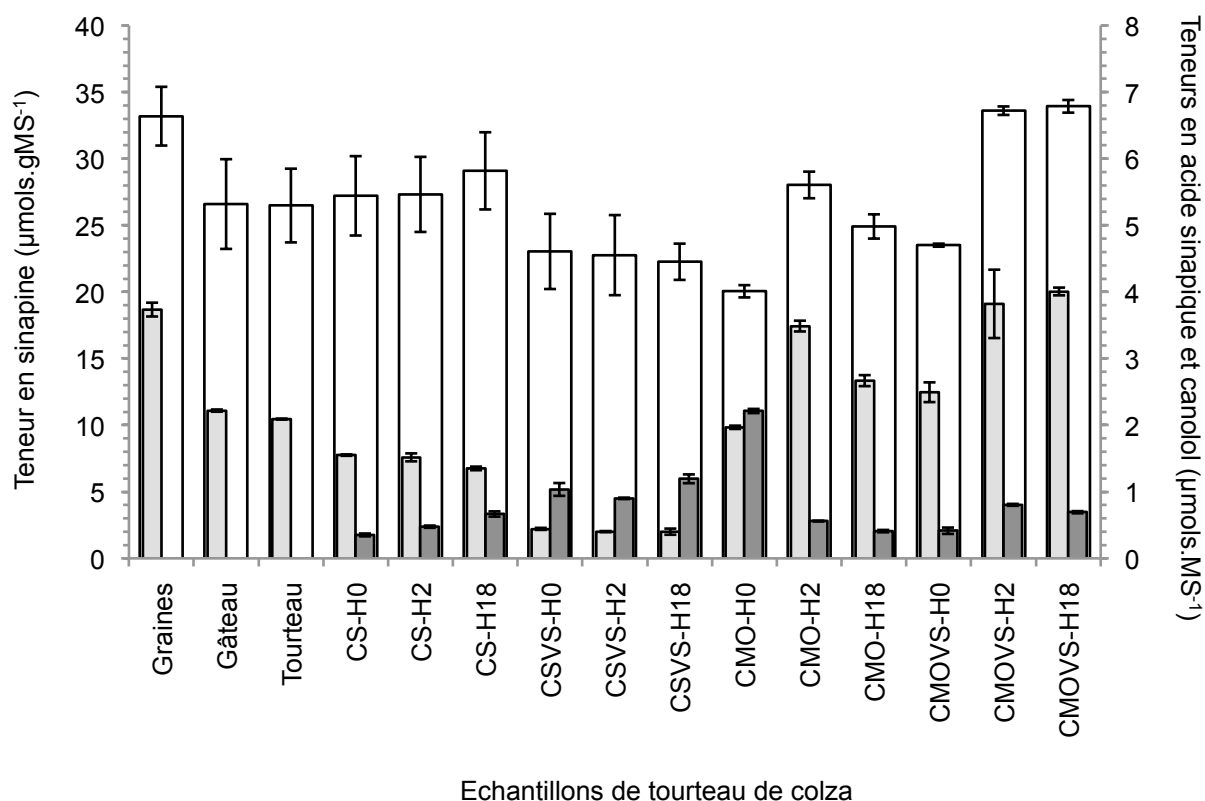


Figure 29. Bilan molaire entre la sinapine (\square), l'acide sinapique (\blacksquare) et le canolol (\blacksquare) dans les échantillons délipidés ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}$). Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n = 3$).

La Figure 30 montre la réaction de conversion de la sinapine en canolol, avec comme produit intermédiaire l'acide sinapique. Selon Artz *et al.* (1986), les composés phénoliques sont principalement localisés dans les cotylédons des plantes plutôt que dans les coques. Dans les graines, la répartition est de 61% de sinapine et 4% d'acide sinapique par rapport aux composés phénoliques totaux. Comme prévu, le canolol n'a pas été détecté.

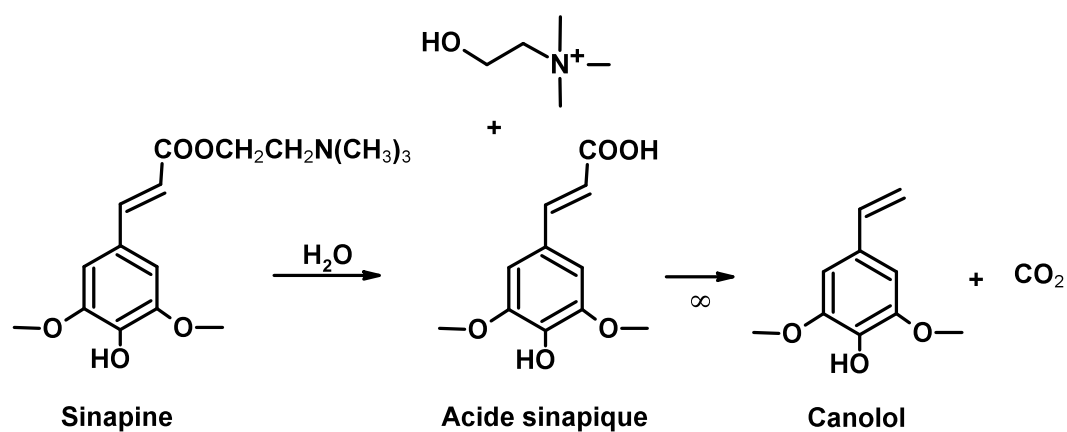


Figure 30. Réaction d'hydrolyse de la sinapine en acide sinapique et sa decarboxylation en canolol.

Les échantillons déshuilés des graines, gâteau et tourteau possèdent des TPC similaires (Tableau 3) ; cependant, leurs compositions en composés phénoliques individuels sont différentes.

Tableau 3. Teneurs en sinapine, acide sinapique, canolol et composés phénoliques totaux (TPC) dans les échantillons déshuilés ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}$).

Echantillons	Sinapine ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}$)	Acide sinapique ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}$)	Canolol ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}$)	TPC ($\mu\text{molEAS.gMS}^{-1}$)
Graines	33.19 \pm 2.20 ^a	3.74 \pm 0.10 ^b	0.00	90.39 \pm 0.85 ^{ab}
Gâteau	26.60 \pm 3.37 ^{bcd}	2.22 \pm 0.02 ^e	0.00	90.98 \pm 1.45 ^{ab}
Tourteau	26.49 \pm 2.77 ^{bcde}	2.09 \pm 0.01 ^{ef}	0.00	88.77 \pm 0.97 ^{ab}
CS-H0	27.22 \pm 2.98 ^{bc}	1.55 \pm 0.01 ^g	0.35 \pm 0.02 ⁱ	79.33 \pm 0.61 ^{cd}
CS-H2	27.32 \pm 2.82 ^{bc}	1.52 \pm 0.06 ^g	0.48 \pm 0.02 ^h	76.17 \pm 0.70 ^d
CS-H18	29.09 \pm 2.90 ^b	1.35 \pm 0.03 ^g	0.67 \pm 0.04 ^e	76.67 \pm 0.40 ^d
CSVs-H0	23.04 \pm 2.82 ^{efg}	0.44 \pm 0.02 ^h	1.03 \pm 0.10 ^c	65.18 \pm 1.12 ^e
CSVs-H2	22.76 \pm 3.01 ^{fg}	0.40 \pm 0.01 ^h	0.90 \pm 0.01 ^d	64.34 \pm 0.39 ^e
CSVs-H18	22.27 \pm 1.36 ^{fg}	0.40 \pm 0.05 ^h	1.19 \pm 0.07 ^b	63.51 \pm 0.24 ^e
CMO-H0	20.05 \pm 0.46 ^g	1.97 \pm 0.02 ^f	2.21 \pm 0.03 ^a	84.95 \pm 3.91 ^{bc}
CMO-H2	28.03 \pm 1.00 ^{bc}	3.49 \pm 0.08 ^c	0.56 \pm 0.01 ^g	74.40 \pm 2.08 ^d
CMO-H18	24.92 \pm 0.91 ^{cdef}	2.67 \pm 0.08 ^d	0.41 \pm 0.02 ⁱ	80.07 \pm 4.16 ^{cd}
CMOVS-H0	23.51 \pm 0.11 ^{defg}	2.49 \pm 0.15 ^d	0.41 \pm 0.05 ⁱ	85.66 \pm 5.85 ^{bc}
CMOVS-H2	33.61 \pm 0.32 ^a	3.82 \pm 0.51 ^{ab}	0.80 \pm 0.01 ^e	96.21 \pm 6.53 ^a
CMOVS-H18	33.94 \pm 0.47 ^a	4.01 \pm 0.06 ^a	0.69 \pm 0.02 ^f	81.15 \pm 3.09 ^{cd}

Dans une même colonne, les valeurs suivies par les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes ($p \leq 0,05$). Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n = 3$).

Le pressage des graines et le déshuilage du gâteau diminuent les teneurs en sinapine de 20% et en acide sinapique de 44% (Tableau 3). Cette réduction pourrait résulter de (i) la formation de complexes entre la sinapine/l'acide sinapique et certains composants de la matrice (protéines, polysaccharides, métaux) sous l'effet de la forte pression exercée lors du broyage des graines ou (ii) de l'action de phénoloxydases endogènes qui n'auraient pas été inactivées avant l'extraction de l'huile. En outre, en raison de sa faible solubilité dans les milieux apolaires, l'acide sinapique pourrait être partiellement éliminé lors des processus de déshuilage.

I.2.3.1 Effet des traitements thermiques

La teneur en sinapine n'a pas été affectée par le procédé de cuisson standard (CS), mais a diminué de 13% lorsque la vapeur d'eau surchauffée a été appliquée (CSVs) (Tableau 3, Figure 29). Ce phénomène peut être attribué à l'hydrolyse de la sinapine en acide sinapique qui, à son tour, a été décarboxylé en canolol (Figure 30).

En effet, la teneur en acide sinapique pour le tourteau torréfié à 105°C avec une injection de vapeur surchauffée (CSVs-H0 = 0.44 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$) était 78% inférieure à celle du tourteau sans injection de vapeur surchauffée (CS-H0 = 1.55 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$), tandis que la concentration en canolol a, elle, augmenté de 67% (0.35 vs 1.03 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$, CS-H0 vs CSVs-H0). Lors du traitement par micro-ondes avec une injection de vapeur surchauffée (CMOVS-H0), 19% d'acide sinapique (2.49 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$) ont été formés en plus par rapport à la teneur en sinapine initialement présente dans le tourteau. Des quantités similaires de canolol ont été produites dans les échantillons CS-H0 et CMOVS-H0 (respectivement 0.35 et 0.41 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$) (Figure 29).

Les traitements par micro-ondes sont supposés favoriser la décarboxylation de l'acide sinapique en canolol pour des températures d'environ 160°C (Spielmeyer *et al.*, 2009). Dans notre cas, ce procédé de torréfaction par micro-ondes (CMO-H0) a produit 80% de plus de canolol que le même processus couplé à une étape de vapeur surchauffée à 180°C (CMOVS-H0). Cependant, dans ces conditions, non seulement la température est différente mais également le temps de cuisson. En ce qui concerne le tourteau torréfié par micro-ondes (CMO-H0), cet échantillon doit être analysé séparément car il a été soumis à une torréfaction aux micro-ondes pendant un intervalle de temps plus court que les autres soumis au même traitement (5 min 33 vs 6 min 15) (Tableau 3). Ainsi, pour cet échantillon, la teneur en sinapine est inférieure de 24% à celle du tourteau non torréfié tandis que celle en acide sinapique n'a pas varié de manière significative (Tableau 3, Figure 29). Le traitement par micro-ondes a donc eu une influence positive sur la formation en canolol mais le temps d'exposition est sans doute le facteur le plus important dans ce procédé. Ces résultats concordent avec ceux de la littérature (Koski *et al.*, 2003; Spielmeyer *et al.*,

2009; Yang *et al.*, 2014). En effet, Spielmeyer *et al.* (2009) ont montré une augmentation de la quantité en canolol d'un facteur de 120 ($4.02 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$) en torréifiant les graines de colza par micro-ondes (2450 MHz, 800 W) à 160°C pendant 7 min 30 avec 5 intervalles de 90 secondes. Yang *et al.* (2014) ont appliqué un traitement par micro-ondes (2.45 GHz, de 1 à 8 minutes) avec des intervalles de 1 minute et obtenu $4.96 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de canolol en 7 minutes, alors qu'en 8 min sa teneur a diminué ($4.63 \mu\text{mol.g}^{-1}$). Ce profil pourrait s'expliquer par la formation du canolol en peu de temps grâce à la torréfaction par micro-ondes, permettant d'éviter la dégradation thermique de cette molécule liée à des périodes d'exposition plus élevées.

L'état de l'art indique que le temps d'exposition, en plus de l'intensité et de la puissance du four à micro-ondes, sont des facteurs déterminants dans la production de canolol, composé chimiquement sensible aux températures élevées (Khattab *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2013; Shrestha *et al.*, 2012; Spielmeyer *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2014). Khattab *et al.* (2014) ont traité les graines de colza et obtenu une conversion de 58% en canolol ($23.21 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$) en utilisant les micro-ondes (puissance 3, 700 W) pendant 13 minutes. Dans notre étude, la plus forte teneur en canolol est de $2.21 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ pour l'échantillon traité aux micro-ondes (2.45 GHz et de 2 kW) pendant 5 minutes 33 (CMO-H0). Ainsi, à partir de $26.6 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ de sinapine présente dans le tourteau non traité (échantillon 3), 24.5% ont été convertis à la fin du traitement de torréfaction de l'échantillon CMO-H0, avec un rendement global en canolol de 34%. Deux avantages résultent des traitements thermiques : ils peuvent être appliqués directement sur le tourteau, et ils peuvent être transférés à l'échelle industrielle.

I.2.3.2 Effet de l'hydratation

L'influence du prétraitement de l'échantillon par hydratation sur les teneurs en sinapine, acide sinapique et canolol a été étudiée en fonction du temps d'incubation (de 2 à 18 heures). Pour les échantillons torréfiés à 105°C avec ou sans injection de vapeur surchauffée (CS et CSVS), les teneurs en sinapine et acide sinapique n'ont pas été significativement influencées par la durée d'incubation ($27\text{-}29 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ pour la sinapine et 1.3-1.5 pour l'acide sinapique (Tableau 3, Figure 29). Concernant

les tourteaux traités par micro-ondes, l'hydratation a eu un effet positif sur les concentrations en sinapine et acide sinapique, un traitement d'une durée 2 heures étant le plus bénéfique. En effet, pour les échantillons torréfiés par micro-ondes (CMO), l'incubation du tourteau hydraté pendant 2 heures a augmenté la teneur en sinapine de 40% ($28 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$) et celle de l'acide sinapique de 77% ($3.49 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$). Après 18 heures d'incubation, les concentrations des deux molécules ont augmenté respectivement de 24% et 36% ($24.9 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ vs $2.67 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$) (Tableau 3).

Les échantillons soumis aux micro-ondes et à la vapeur surchauffée (CMOVS) présentent des teneurs plus élevées en sinapine et acide sinapique que l'échantillon non-hydraté (CMOVS-H0) (respectivement 12 et 4 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$ vs 23.5 et 2.5 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$), sans différence significative entre 2 et 18 heures (Tableau 3). Comme d'autres auteurs l'ont déjà souligné (Khattab *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014), ces résultats confirment que les micro-ondes, en raison de leur particularité, permettent la libération de composés phénoliques non extractibles du tourteau, en particulier quand une étape d'hydratation est appliquée au préalable.

Pour les échantillons torréfiés avec injection de vapeur surchauffée (CSVVS), la teneur en canolol a augmenté de 16% ($1.19 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$) quand le tourteau a été humidifié pendant 18 heures (CSVVS-H18), alors que deux heures d'hydratation (CSVVS-H2) conduisent à une diminution de 11% ($0.90 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$). Parmi ces échantillons traités avec une injection de vapeur surchauffée (CSVVS), le temps d'hydratation de 18 heures (CSVVS-H18) permet la formation de la plus grande quantité de canolol ($0.69 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$).

Comme évoqué précédemment, l'échantillon CMO-H0 a été torréfié pendant 5 min 33 alors que les autres échantillons traités par micro-ondes l'ont été pendant 6 min 15 ; ce paramètre semble être le facteur le plus influent sur la production de canolol en termes de traitement thermique. Ce dernier a produit plus de canolol que tous les autres traitements ($2.21 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$) (Tableau 3, Figure 29). En tenant compte de ce résultat, et en comparant uniquement les tourteaux hydratés et torréfiés par micro-ondes (CMO-H2 et CMO-H18), l'augmentation du temps d'incubation diminue les teneurs en canolol de 0.56 à $0.41 \mu\text{mol.gMS}^{-1}$ (Tableau 3). Pour les échantillons

torréfiés par micro-ondes avec une injection de vapeur surchauffée (CMOVS-H0), ceux hydratés correspondant à CMOVS-H2 et CMOVS-H18 favorisent la formation respectivement de 50% et 40% de canolol de plus (0.80 et 0.69 vs 0.41 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$).

Dans cette étude, il a été constaté que le temps d'hydratation n'influencait pas la teneur en sinapine et acide sinapique pour les échantillons torréfiés par cuisson simple (CS et CSVS), mais lorsqu'ils étaient soumis à des traitements par micro-ondes, ce facteur avait un effet positif sur la libération de ces composés. En effet, l'augmentation du temps d'hydratation augmente la teneur en canolol pour les échantillons torréfiés classiquement (CS et CSVS), alors que les teneurs en acide sinapique et sinapine restent inchangées. Concernant tous les échantillons torréfiés par micro-ondes, avec ou sans injection de vapeur surchauffée (CMO et CMOVS) après 2 et 18 heures hydratation, les concentrations en canolol ont diminué alors que celles en acide sinapique sont similaires. Il est donc important de savoir que les quantités finales en canolol ont été non seulement déterminées par celles en acide sinapique formé lors de l'hydrolyse de la sinapine, mais aussi par la température, le temps d'exposition et la source de chaleur (Niu *et al.*, 2013; Pudel *et al.*, 2014; Spielmeyer *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014). L'exposition du tourteau pendant de longues périodes et à des températures élevées conduit à une dégradation du canolol en raison de sa faible stabilité thermique.

1.3 CONCLUSION

L'influence des traitements thermiques et d'hydratation sur les composés phénoliques totaux, et les teneurs en sinapine, acide sinapique et canolol a été étudiée. Bien que la TPC n'ait pas été modifiée par les étapes de déshuilage, l'influence des traitements de torréfaction a été plus contrastée. La torréfaction classique (CS ou CSVS) s'avère la moins favorable pour la conversion en canolol et l'influence de l'hydratation sur les teneurs des composés phénoliques peu significative. Ces résultats indiquent d'une part, l'absence d'hydrolyse de la sinapine par les enzymes endogènes et que la température élevée est responsable de la diminution de la TPC. D'autre part, la TPC a été moins affectée par les traitements par micro-ondes en dépit de températures plus élevées (160 - 180°C). Ces résultats

peuvent s'expliquer par la libération des composés phénoliques sous l'effet des micro-ondes et de l'hydratation, mais aussi par la réduction probable des phénomènes de dégradation.

En ce qui concerne les composés phénoliques individuels, comme attendu, tous les traitements ont permis la conversion de la sinapine en acide sinapique et la décarboxylation de ce dernier en canolol, avec toutefois des grandes différences dans les profils de teneur entre les échantillons soumis à la torréfaction simple (CS, CSVS) ou torréfiés par micro-ondes (CMO, CMOVS).

Dans le cas de la torréfaction classique, l'effet des prétraitements par hydratation n'a pas été significatif et la teneur la plus élevée en canolol (de 0.67 à 1.03 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$) a été obtenue à 160°C. Cependant, cette teneur très faible, en comparaison avec les quantités de sinapine et d'acide sinapique converties, met en évidence la dégradation des composés phénoliques et en particulier celle du canolol dans de telles conditions de traitement.

Enfin, à l'exception de CMO-H0, les quantités de sinapine et d'acide sinapique ont été affectées positivement par les procédés par micro-ondes. Plus particulièrement, l'utilisation de hautes températures (CMOVS) et les traitements d'hydratation avant la torréfaction ont eu un effet positif significatif bien que, dans le même temps, la production de canolol soit restée faible (0.41 - 0.80 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$). Il est à noter que l'échantillon CMO-H0 a montré la plus forte teneur en canolol, soit 2.21 $\mu\text{mol.gMS}^{-1}$, ce qui correspond à une teneur 5.6 fois plus élevée que celle obtenue pour le même traitement avec de la vapeur surchauffée à 180°C (CMOVS-H0). Ce résultat inattendu a été attribué à la plus courte durée d'exposition de CMOVS-H0 (5 min 33 au lieu de 6 min 15 pour les autres traitements par micro-ondes), qui a vraisemblablement limité la dégradation du canolol, molécule sensible à la chaleur. Ceci suggère que le temps d'exposition est le paramètre essentiel pour les traitements aux micro-ondes (CMO). À la lumière de ce qui précède, une optimisation de la production de canolol grâce à des procédés industriels par micro-ondes avec injection de vapeur surchauffée (CMOVS) pourrait être envisagée sur les tourteaux pré-hydratés en appliquant les temps d'exposition appropriés.

II. SYNTHÈSE DU CANOLOL ET DU 4-VINYLGUAIACOL A PARTIR DES HYDROXYBENZALDEHYDES CORRESPONDANTS

Le canolol (4-vinylsyringol) n'est pas un produit commercialement disponible et son extraction, à partir de matières premières renouvelable où il est peu concentré, s'avère encore difficile et fastidieuse. Par conséquent, le canolol utilisé comme standard pour la caractérisation et le dosage des composés phénoliques dans les tourteaux de colza, ainsi que pour les réactions de fonctionnalisation a été synthétisé selon un protocole décrit dans la littérature (Simpson *et al.*, 2005). De même, le 4-vinylguaiaacol, un autre représentant de la famille des vinylphénols et de structure proche de celle du canolol, a été à son tour synthétisé selon le même procédé.

Ces dernières années, plusieurs voies de synthèse des vinylphénols ont été rapportées dans la littérature. On peut citer la déshydrogénation catalytique d'éthylphénols, la réaction de Wittig appliquée aux aldéhydes phénoliques ou encore la décarboxylation d'acides (hydroxy)cinnamiques (Sinha *et al.*, 2007). Dans le cas d'extraits naturels, où les composés phénoliques peuvent se trouver sous forme d'esters d'acides hydroxycinnamiques, une étape préliminaire d'hydrolyse s'avère nécessaire à l'obtention de bons résultats.

Bernini *et al.* (2007) ont décrit de nouvelles conditions expérimentales permettant la décarboxylation de l'acide sinapique par micro-ondes avec un rendement satisfaisant, en présence de DBU (2,3,4,6,7,8,9,10-Octahydropyrimido[1,2-a]azépine), d'oxyde d'aluminium et d'hydroquinone. La décarboxylation à haute température (200-300°C) des acides *trans*-cinnamiques assistée par les métaux de transition tels que le cuivre est la méthode la plus largement utilisée pour la synthèse chimique de styrènes à échelle industrielle. Takemoto et Achiwa (2001) ont proposé une méthode douce de décarboxylation (25°C) de l'acide phénylacrylique en 4-hydroxystyrène en utilisant différentes cultures de cellules végétales. Les rendements obtenus se sont avérés relativement faibles, de l'ordre de 10 à 30%, après 3 jours de réaction. De leur côté, Baqueiro-Pena *et al.* (2010) ont réalisé, en 120 heures, la décarboxylation de l'acide férulique (en solution dans le méthanol à

800 mg.L⁻¹) avec une conversion de 57%, en employant une souche sauvage d'*Aspergillus Niger*.

La majorité de ces procédés de synthèse requièrent plusieurs étapes et traitements, parfois l'utilisation de réactifs onéreux et des conditions opératoires assez sévères pour finalement des taux de conversion assez faibles. Récemment, une voie de synthèse plus performante et réalisée dans des conditions relativement douces, a été décrite : il s'agit d'une transformation basée sur la réaction de Knoevenagel-Doebner (Simpson *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2007) qui met en jeu un aldéhyde phénolique, une base organique faible et l'acide malonique. Cette voie de synthèse a été sélectionnée pour les synthèses du canolol et du 4-vinylguaiacol car, outre l'avantage d'être mise en œuvre dans les conditions réactionnelles modérées, les précurseurs de départ, respectivement le syringaldéhyde et la vanilline, sont commercialement disponibles et bon marché.

La réaction de Knoevenagel-Doebner, ou plus précisément la réaction de Knoevenagel modifiée par Doebner, consiste à convertir un aldéhyde en acide α -éthylénique en présence d'une base aminée (pyridine ou pipéridine) et d'acide malonique. En général la base aminée arrache un proton à l'acide malonique (ou du malonate d'éthyle) présent dans le milieu pour former un carbanion qui va à son tour attaquer le carbonyle de l'aldéhyde donnant lieu à un alcool intermédiaire. L'élimination d'une molécule d'eau et la décarboxylation se produisent de façon simultanée pour aboutir à l'acide α -éthylénique correspondant.

Avec comme objectif de produire une gamme d'acides 4-hydroxycinnamiques substitués, Simpson *et al.* (2005) ont eu recours à la réaction de Knoevenagel-Doebner en modifiant légèrement le traitement du mélange après réaction (section IV du chapitre 2). En effet, au lieu d'arrêter la réaction par neutralisation à l'acide chlorhydrique de la pyridine, cette dernière a été évaporée sous vide en présence de toluène. Suite à cette modification, ils ont constaté que si les 2-hydroxybenzaldéhydes conduisaient à un mélange d'acides hydroxycinnamiques et de vinylphénols, les 4-hydroxybenzaldéhydes, en revanche, donnaient lieu uniquement à la formation de vinylphénols, mettant ainsi en lumière l'existence d'un phénomène de double décarboxylation.

Le fait que seuls les 4-hydroxybenzaldéhydes génèrent exclusivement des vinylphénols suggère fortement la participation d'un intermédiaire de type quinone dans l'étape de double décarboxylation. Les auteurs ont avancé l'hypothèse que l'élimination de la molécule d'eau lors de la première étape était accompagnée par la formation d'un intermédiaire de type quinone méthide (Figure 31) (Aldabalde, 2011), qui en subissant une double décarboxylation, conduisait au dérivé vinylphénol correspondant.

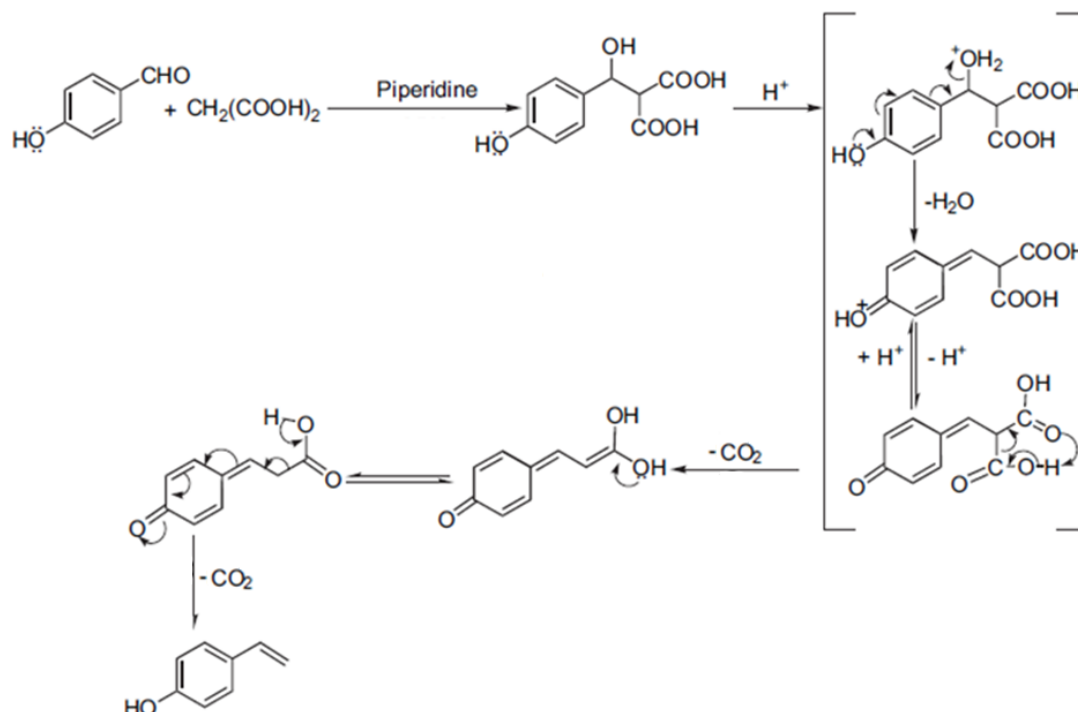


Figure 31. Mécanisme général proposé pour la synthèse des vinylphénols à partir de leurs aldéhydes correspondants [adapté de Sinha *et al.* (2007)].

En se basant sur les travaux de Simpson *et al.* (2005), la réaction a été appliquée au syringaldéhyde (3,5-diméthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde) et à la vanilline (3-méthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde) en présence d'acide maléique et d'un large excès de pipéridine pour donner respectivement le canolol (**1**, rendement = 47%) et le 4-vinylguaiacol (**2**, rendement = 74%) (Figure 32).

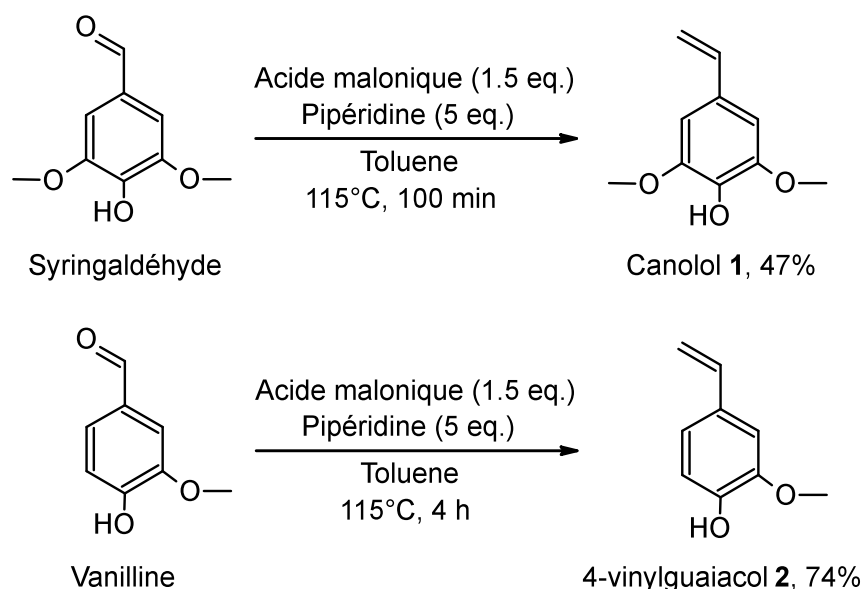


Figure 32. Réaction de synthèse du canolol et du 4-vinylguaiacol à partir respectivement du syringaldéhyde et de la vanilline.

La différence de réactivité entre le syringaldéhyde et la vanilline peut être expliquée par leurs différences structurales. La présence de deux groupements méthoxy, en position *ortho*, sur le cycle aromatique du syringaldéhyde, a tendance à renforcer l'électronégativité du groupement hydroxyle, rendant son proton plus labile. Cela favorise la formation de l'intermédiaire quinone méthide. De ce fait, le produit **1** est formé plus rapidement que **2** (100 min vs. 240 min, respectivement). Cependant, malgré la conversion totale du syringaldéhyde en canolol, ce dernier a été isolé avec un rendement plus faible (47%) du fait de sa rapide dégradation au cours des étapes de purification. En effet, contrairement au 4-vinylguaiacol, le canolol s'est avéré très sensible à l'air et à la lumière.

III. REACTIONS DE FONCTIONNALISATION

III.1 EFFET DE LA LIPOPHILISATION DES VINYLPHENOLS SUR LEUR ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Les vinylphénols sont connus pour leurs propriétés organoleptiques et leur rôle comme agents de saveur importants dans certains produits fermentés comme la bière ou le vin. Le 4-vinylguaiacol (4-éthényl-2-méthoxyphénol), par exemple, est utilisé dans la fabrication des parfums et des arômes alimentaires et constitue l'un des additifs alimentaires approuvés par certains organismes de réglementation [Comité mixte d'experts des additifs alimentaires (JECFA) ; *Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States* (FEMA)]. Issu de la décarboxylation de l'acide férulique par des traitements biocatalytiques ou thermiques (Callemien *et al.*, 2006; Vanbeneden *et al.*, 2008) ce composé est également employé comme intermédiaire en synthèse organique ou en formulation de certains biopolymères (Mabinya *et al.*, 2010; Rosazza *et al.*, 1995).

Depuis peu, le canolol (Galano *et al.*, 2011; Kuwahara *et al.*, 2004; Wakamatsu *et al.*, 2005) et le 4-vinylguaiacol (Terpinc *et al.*, 2011) sont décrits comme de puissants piègeurs de radicaux libres et des molécules susceptibles de lutter efficacement contre le stress oxydatif. Cependant, la polarité de ces molécules peut s'avérer être un frein à leur utilisation en tant qu'antioxydants ainsi qu'à leur efficacité dans les systèmes lipidiques complexes comme les émulsions. En effet, dans de tels systèmes où l'oxydation lipidique se produit à l'interface huile/eau, l'efficacité d'un antioxydant dépend de sa capacité à se placer à l'interface. En d'autres termes, outre sa réactivité intrinsèque, le caractère amphiphile d'un antioxydant et donc son affinité pour l'interface huile/eau conditionne sa capacité à contrer l'oxydation dans les systèmes lipidiques multiphasiques. Aussi, pour un antioxydant polaire, la lipophilisation qui consiste à moduler le caractère amphiphile par le greffage d'une chaîne lipidique appropriée, constitue un moyen simple et efficace permettant d'améliorer (i) sa dispersion et sa capacité antioxydante dans des systèmes lipidiques complexes, mais également (ii) ses interactions avec les membranes biologiques et exprimer ainsi des propriétés antimicrobiennes (Figueroa-Espinoza et

Villeneuve, 2005; Laguerre *et al.*, 2013a; Laguerre *et al.*, 2013b; Suriyarak *et al.*, 2013).

A notre connaissance, aucune étude visant à produire des antioxydants lipophiles à partir du canolol **1** ou du 4-vinylguaïacol **2**, n'a été entreprise à ce jour. Les sections suivantes de ce chapitre sont donc consacrées, d'une part, à la lipophilisation du canolol et du 4-vinylguaïacol et, d'autre part à l'évaluation de la capacité antioxydante des molécules synthétisées en système émulsionné et aux relations structure-activité qui en découlent.

III.1.1 Lipophilisation par addition de peracides, générés *in situ* en présence de la lipase B de *Candida antarctica*

La lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) est un excellent catalyseur pour une large gamme de réactions chimiques telles que l'acylation (Acherar *et al.*, 2003; Schoenstein *et al.*, 2013; Turcu *et al.*, 2007), l'estérification, la transestérification (Itabaiana *et al.*, 2013), l'interestérification (Perignon *et al.*, 2013), l'hydrolyse (Cabrera *et al.*, 2010; Paál *et al.*, 2007) et la polymérisation (Palmans et Heise, 2010). Affichant une bonne stabilité dans différents milieux, elle agit à l'interface lipide/eau et présente une sélectivité pour des acides gras de chaînes moyennes à longues (Bornscheuer *et al.*, 2002). Les réactions de lipophilisation des composés phénoliques, et plus particulièrement des acides benzoïques et hydroxycinnamiques par estérification ou transestérification catalysées par cette enzyme ont largement été étudiées. Par exemple, Guyot *et al.* (1997) ont étudié la lipophilisation catalysée par CAL-B de différents acides phénoliques (cinnamique, caféique, férulique et diméthoxycinnamique) en présence de divers alcools gras. Stamatis *et al.* (1999) ont étudié l'estérification des acides, caféique, coumarique, férulique, *p*-hydroxybenzoïque, ascorbique et certains dérivés d'acide cinnamique avec l'octanol-1 en présence de CAL-B. López-Giraldo *et al.* (2007) ont proposé pour leur part une synthèse chimio-enzymatique de chlorogénates d'alkyle à partir d'acide chlorogénique (ou son ester méthylique) et d'alcools primaires aliphatiques de 4 à 16 atomes de carbone. Enfin, Sabally *et al.* (2006) ont étudié la réaction de transestérification de l'acide dihydrocaféique avec de l'huile de lin. Cependant, ces

transformations nécessitent un temps de réaction assez long pour des taux de conversion généralement faibles.

La lipase B peut également agir comme une perhydrolase en convertissant les acides carboxyliques en leurs peracides correspondants en présence de solutions aqueuses de peroxyde d'hydrogène (Bernhardt *et al.*, 2005). Ces peracides, produits *in situ*, peuvent être ensuite utilisés pour des réactions d'époxydation d'oléfines. Dans ce cas, le peroxyde d'hydrogène est donneur d'oxygène et le peracide joue le rôle de transporteur d'oxygène vers la double liaison. Toutefois, il a été constaté que face à des doubles liaisons possédant un caractère nucléophile très prononcé, le peracide pouvait modifier son activité pour devenir un agent électrophile capable de s'ajouter sur la double liaison. Ainsi, il a été rapporté par Chen *et al.* (2002) que la réaction de l'alcool O-benzyle coniférylique avec l'acide *m*-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) dans le dichlorométhane donnait lieu à l'addition du peracide sur la double liaison en α par rapport au cycle aromatique (Figure 33).

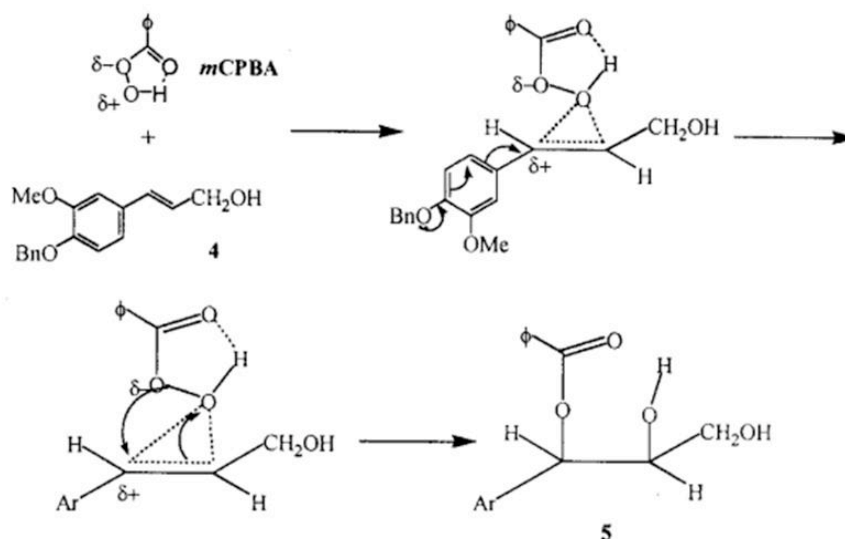


Figure 33. Mécanisme de la réaction d'addition électrophile du *m*-CPBA sur la liaison vinylique de l'alcool O-benzyle coniférylique (Chen *et al.*, 2002).

Cette réaction inattendue du peracide, qui était plutôt sensée conduire à l'époxydation de la double liaison, a été attribuée à la présence des substituants O-benzyl et O-méthyl, qui, par effet mésomère donneur, contribuent non seulement au renforcement du caractère nucléophile de la double liaison mais aussi à sa

polarisation, ce qui oriente le mécanisme réactionnel vers une addition électrophile du peracide.

En considérant la structure chimique des vinylphénols, on constate qu'ils possèdent une double liaison vinylique conjuguée à un cycle aromatique substitué par des groupements donneurs. Ces composés, sont donc tout à fait adaptés pour subir des réactions d'addition électrophiles en présence de peracides. De ce fait, nous avons exploité l'activité perhydrolase de CAL-B pour étudier la réaction de lipophilisation du canolol **1** et du 4-vinylguaiacol **2** par l'addition peracides issus de divers acides gras sur leurs doubles liaisons vinyliques. Les peracides ont été formés *in situ* par perhydrolyse d'acides carboxyliques comportant 2 à 18 atomes de carbone dans une solution de peroxyde d'hydrogène (Orellana-Coca *et al.*, 2005b). Dans un deuxième temps, l'activité antioxydante des adduits obtenus a été évaluée au moyen du test des Triènes Conjugués Auto-oxydables, CAT (*Conjugated Autoxidizable Triene assay*).

III.1.1.1 Protection des vinylphénols par silylation

Avant d'aborder la réaction de lipophilisation, les groupements hydroxyles des composés **1** et **2** ont été protégés temporairement afin d'éviter toute réaction parasite telle qu'oxydation compétitive ou polymérisation. Parmi plusieurs groupements protecteurs, le *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) a été choisi en raison de sa stabilité dans différents milieux réactionnels et pour la facilité avec laquelle il peut être introduit et éliminé dans des conditions douces (Mancilla *et al.*, 2010; Runarsson *et al.*, 2008). En effet, le groupement *tert*-butyldiméthylsilyloxy est assez stable face à l'hydrolyse. Généralement commercialisé sous la forme de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle, il est couramment utilisé comme agent de silylation. En raison de sa faible vitesse de réaction, un co-substrat comme l'imidazole est souvent employé afin de l'activer et de permettre à la réaction de se produire à des températures modérées (Corey et Venkates, 1972) (Figure 34). Dans la première étape de réaction, un N-*tert*-butyldiméthylsilyle imidazole est formé :

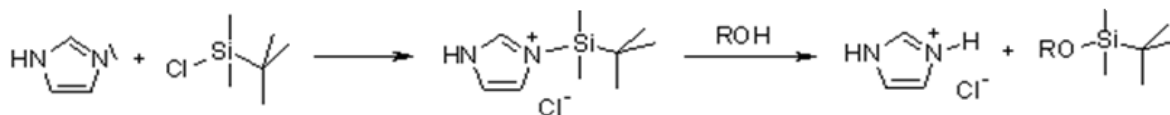


Figure 34. Protection d'un alcool (ROH) en utilisant le chlorure de *tert*-buthyldimethylsilyle en présence d'imidazole (Corey et Venkates, 1972).

Dans la seconde étape, l'oxygène nucléophile de l'alcool attaque le silicium de l'intermédiaire libérant une molécule de chlorure d'imidazolium et l'éther de *tert*-buthyldimethylsilyle.

Le traitement des composés **1** et **2** avec du chlorure de *tert*-buthyldiméthylsilyle et de l'imidazole à température ambiante a conduit à la production des éthers de *tert*-buthyldimethylsilyle **3** et **4** avec des rendements respectifs de 74% et 85% (Figure 35).

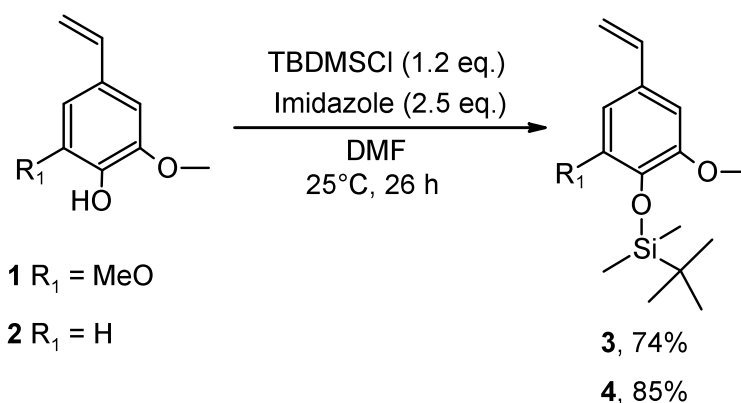


Figure 35. Protection de l'hydroxyle phénolique du 4-vinylguaiacol et du canolol par silylation au chlorure de N-*tert*-buthyldiméthylsilyle.

Les molécules protégées de la sorte pourraient alors être soumises à des réactions de lipophilisation de leur double liaison vinylique en s'affranchissant des risques de réactions parasites liées au groupement hydroxyle libre.

III.1.1.2 Addition de peracides sur la liaison vinylique et formation d'hydroxyesters

Différents paramètres de réaction peuvent influencer l'activité enzymatique et la formation des peracides, notamment la nature du solvant, la température et la

concentration en peroxyde d'hydrogène. Parmi les solvants organiques testés, les rendements les plus élevés en peracides ont été observés avec le toluène ou l'hexane (Bjorkling *et al.*, 1990). Les travaux de Törnvall *et al.* (2007) et Orellana-Coca *et al.* (2005a) ont montré que des températures élevées (supérieures à 60°C) couplées à des concentrations élevées en peroxyde d'hydrogène (de 6 à 12 mol.L⁻¹) donnaient lieu à une perte rapide de l'activité enzymatique. Sur la base de ces différents éléments, la réaction du dérivé vinylique **4** avec le peracide octanoïque a été effectuée en deux étapes. Tout d'abord, la perhydrolyse de l'acide octanoïque catalysée par lipase B de *Candida antarctica* sous forme immobilisée (Novozyme 435) a été initiée à 40°C pendant 30 minutes dans du toluène. Puis, le composé **4** en solution dans le même solvant a été ajouté au mélange précédant pendant 2 heures. Tout au long de cette réaction, la concentration en peroxyde d'hydrogène n'a pas excédé 1 mol.L⁻¹. Après consommation totale du peracide et traitement du milieu réactionnel (décrit dans la partie expérimentale), le produit brut a été traité avec du fluorure de tétra-N-butylammonium (TBAF) dans du THF à 0°C, ce qui a conduit au clivage de l'éther de silyle et à la régénération du groupement hydroxyle au bout de 3 heures de réaction.

L'élimination du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle par le TBAF (Figure 36) provient de l'attaque nucléophile de l'anion fluorure sur l'atome de silicium qui conduit à la formation d'un intermédiaire pentavalent de silicium. La formation de la liaison Si-F contribue à une élimination rapide du groupement *tert*-butyldiméthylsilyle. La récupération du groupement hydroxyle se produit par l'addition, en milieu aqueux et à température ambiante, d'un proton fourni par un acide tel que l'acide acétique (Corey et Venkates (1972).

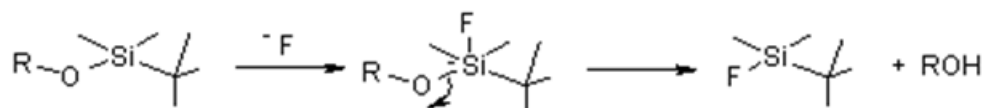


Figure 36. Elimination du groupement *N-tert*-butyldiméthylsilyle assistée par l'ion fluorure en milieu acide.

Après l'addition électrophile du peracide sur le composé **4**, suivie de la déprotection de son hydroxyle phénolique, les hydroxyesters phénoliques **5d** et **6d** ont été obtenus avec un rendement global de 76% (**Figure 37**).

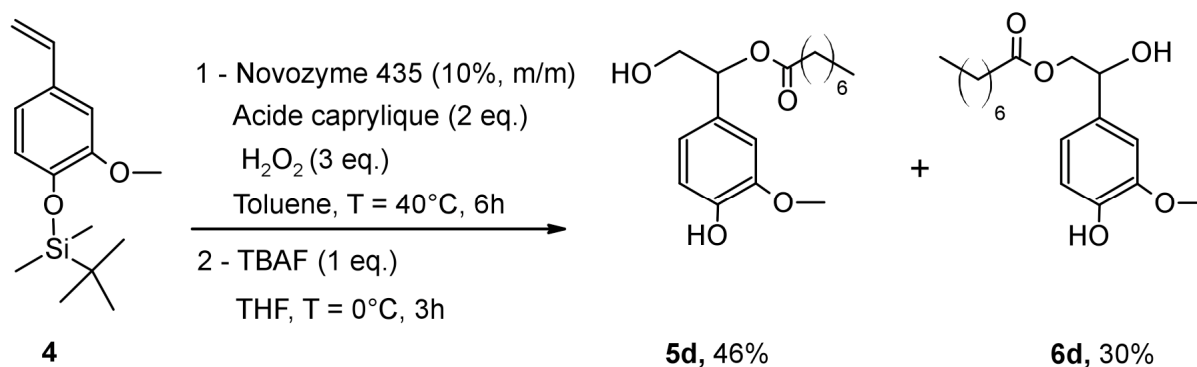


Figure 37. Estérification du composé **4** suivie de la déprotection de son groupement hydroxyle.

Concernant la formation du peracide catalysée par la lipase, la réaction est réalisée entre l'acide carboxylique et le site actif de la serine de l'enzyme pour former un intermédiaire acyle-enzyme qui réagit à son tour avec le peroxyde d'hydrogène pour former un peracide (Aouf *et al.*, 2014). En règle générale, lors de l'oxydation chimio-enzymatique des oléfines, la lipase catalyse la formation de peracides qui donnent ensuite un atome d'oxygène à la double liaison en formant l'époxyde correspondant et en régénérant les acides carboxyliques. Toutefois, dans le cas présent, les peracides générés n'effectuent pas leur rôle attendu de transporteur d'oxygène. Il se produit plutôt une addition électrophile sur la double liaison vinylique.

Comme mentionné précédemment, la présence des substituants donneurs d'électrons sur le cycle aromatique contribuent, par effet mésomère, à augmenter la densité électronique de la double liaison vinylique. L'oxygène électrophile du peracide attaque la double liaison formant un état de transition tricyclique (I) (Figure 38) (Chen *et al.*, 2002). Ensuite, le groupement carboxylate du peracide, riche en électrons attaque les carbones de la double liaison selon les voies A ou B (Figure 38), conduisant au clivage simultané des liaisons entre ces atomes de carbone et l'oxygène du peroxyde, et à la formation des deux hydroxyesters **5** et **6** dans le cas du 4-vinylguaiacol silylé **4**.

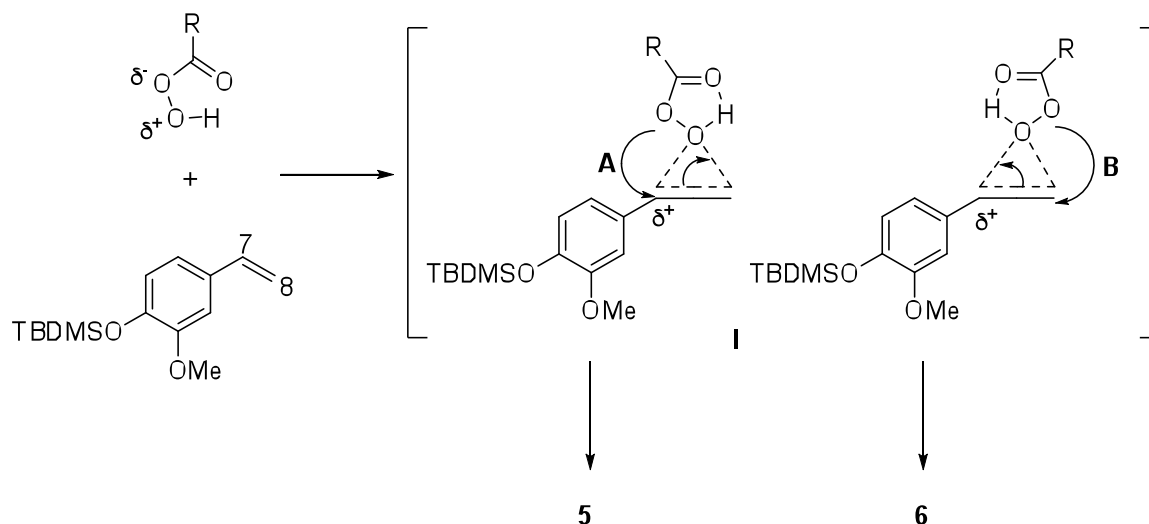
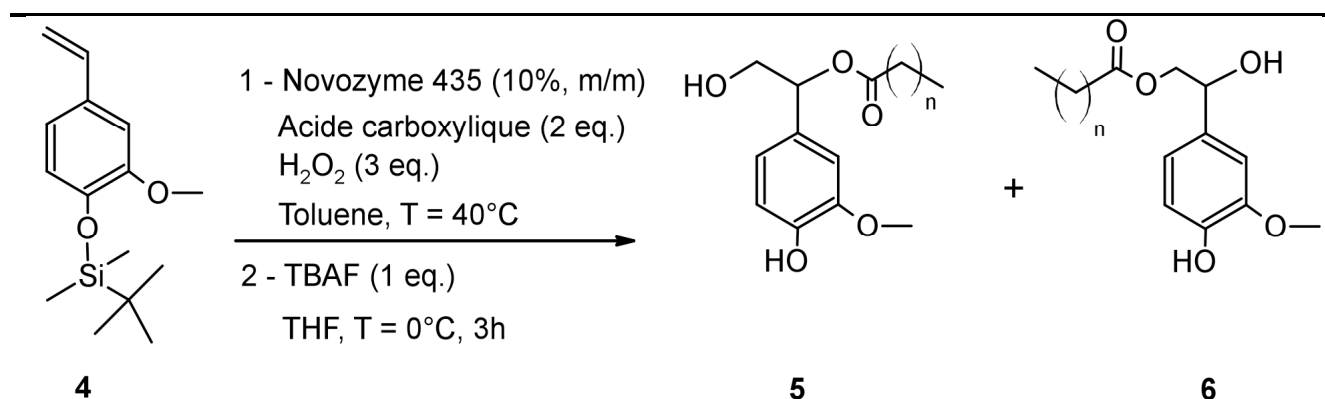


Figure 38. Mécanisme de lipophilisation de la double liaison vinylique du 4-vinylguaiacol silylé **4** et formation d'hydroxyesters isomères.

L'intervention des groupements donneurs d'électrons dans l'orientation du mécanisme de réaction vers l'addition des peracides a été confirmée de façon indirecte par Sarma *et al.* (2007). Ces derniers ont en effet démontré qu'en présence de peracides, les dérivés du styrène comportant des substituants électroattracteurs conduisaient aux produits d'époxydation et non aux produits d'addition électrophile.

Dans notre étude, l'addition du peracide éthanoïque sur le composé **4** a été confirmée par RMN. En effet, les signaux des protons caractéristiques de la double liaison vinylique, à 5.07, 5.64 et 6.67 ppm ont disparu et ont été remplacés par les signaux des protons des α -hydroxyles (3.78-3.86 ppm pour **5** et 4.89 ppm pour **6**) et des α -esters (5.79 ppm pour **5** et 4.16-4.25 ppm pour **6**). Enfin, l'apparition des signaux des protons aliphatiques blindés sur le spectre de RMN ^1H et le signal du carbonyle de l'ester sur le spectre RMN ^{13}C indiquent bien qu'il y a eu addition de l'acide carboxylique sur **4**. Sur la base de ces résultats, d'autres acides carboxyliques aliphatiques de 2 à 18 atomes de carbone ont été utilisés pour évaluer la réactivité du composé **4** avec leurs peracides correspondants. Nous avons également pour objectif de produire des hydroxyesters phénoliques avec différentes longueurs de chaînes afin d'évaluer leur activité antioxydante. Les produits des réactions de lipophilisation sont présentés dans le Tableau 4 et sur la Figure 39.

Tableau 4. Produits d'addition électrophile de peracides, générés *in situ* à partir des acides carboxyliques correspondants, sur le composé **4** (après déprotection de l'hydroxyle phénolique).



Entrée	Acide carboxylique	Temps de réaction (h)**	Produits	Rendements (%)	Rendement globale (%)	Valeur CAT
1	Ethanoïque (n=0)*	126	5a 6a	33 -	33	0.46 ± 0.05 -
2	Butanoïque (n=2)*	102	5b 6b	26 22	48	0.80 ± 0.04 0.49 ± 0.01
3	Hexanoïque (n=4)	4	5c 6c	43 32	75	0.55 ± 0.01 0.19 ± 0.05
4	Octanoïque (n=6)	6	5d 6d	46 30	76	0.57 ± 0.03 0.24 ± 0.02
5	Décanoïque (n=8)	7	5e 6e	43 31	74	0.24 ± 0.04 0.22 ± 0.07
6	Dodécanoïque (n=10)	6.5	5f 6f	77 -	77	0.19 ± 0.04 -
7	Hexadécanoïque (n=14)	24	5g 6g	68 -	68	0.19 ± 0.02 -
8	Octadécanoïque (n=16)	20	5h 6h	72 -	72	0.12 ± 0.02 -

* Les réactions du composé **4** avec les acides hexanoïque à octadécanoïque ont été réalisées avec 10% d'enzyme (m/m, par rapport à la masse de **4**), contre respectivement 30% et 20% avec les acides éthanoïque et butanoïque.

** La réaction a été suivie par CCM et arrêtée après disparition complète de **4**.

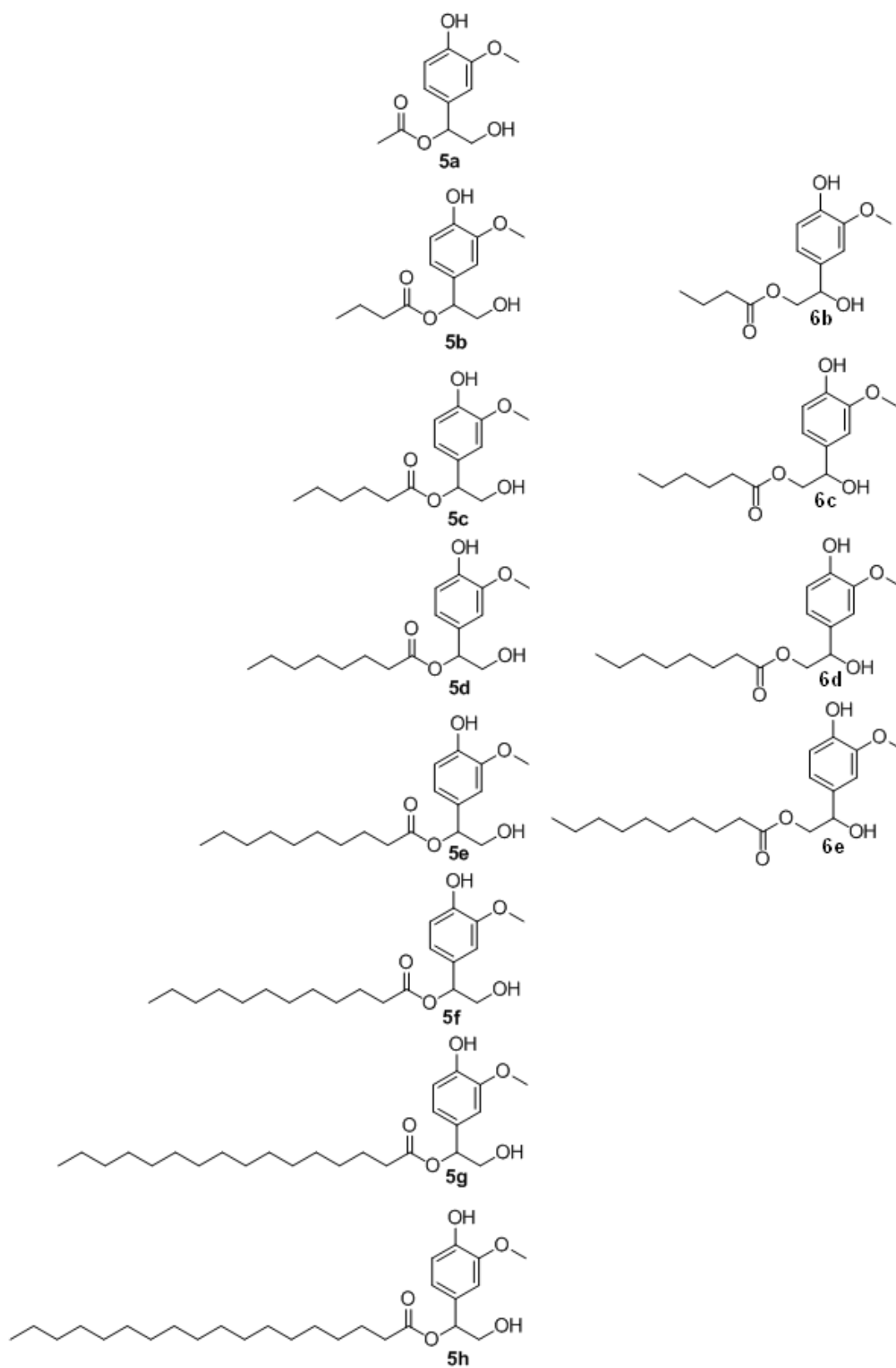


Figure 39. Structures chimiques des hydroxyesters phénoliques **5a** à **5h** et **6b** à **6e**.

Comme le montre le Tableau 4, les hydroxyesters résultants de l'addition des peracides à chaînes moyennes et longues (entrées 3 à 8) sur la double liaison vinylique de **4** ont été obtenus avec des rendements assez proches allant de 68% à 77%. En revanche, la réaction de **4** avec les peracides éthanoïque et butanoïque (entrées 1 et 2) a requis plus de temps et une plus grande quantité d'enzyme pour donner les produits d'addition **5a**, **5b** et **6b**, avec des rendements relativement faibles n'excédant pas 50%. Ces différences sont probablement dues à la stabilité des peracides qui dépend fortement de leurs masses moléculaires. En effet, plus les peracides sont légers, plus rapide est leur décomposition, les peracides méthanoïque et éthanoïque étant particulièrement instables (Lefort *et al.*, 1985). Par ailleurs, la désactivation de l'enzyme en présence d'acides carboxyliques polaires à courte chaîne ou sa faible activité vis-à-vis de ces acides ne peuvent être totalement écartées.

La réaction du composé **4** avec le peracide butanoïque a conduit à la formation de deux produits d'addition **5b** et **6b** avec une légère prédominance de l'isomère **5b** portant une fonction alcool primaire. La même tendance est observée avec les peracides hexanoïque, octanoïque et décanoïques, indiquant que les peracides comportant 4 à 10 atomes de carbone présentent la même réactivité vis à vis du composé **4**. Bien que la prédominance des produits de type **5** (hydroxyesters à fonction alcool primaire) ne soit pas très significative, elle résulte de l'addition de l'hydroxyle électrophile du peracide sur le carbone le plus « nucléophile » de la double liaison.

Enfin, avec les peracides à chaîne plus longue (dodécanoïque, hexadécanoïque et octadécanoïque, entrées 6 à 8, Tableau 4), seuls les produits de type **5** sont formés. On peut supposer que la présence d'une longue chaîne alkyle sur l'intermédiaire réactionnel **I** (Figure 38) polarise d'avantage la double liaison entre les carbones C7 et C8 de **4** avec, comme conséquence, la délocalisation de la charge négative sur le carbone C8 et l'attaque exclusive du carbone C7 (plus faible en électrons) par le groupe carboxylate. En raison de la forte affinité de l'enzyme pour l'acide dodécanoïque (Bjorkling *et al.*, 1990), son peracide correspondant conduit au produit d'addition unique **5f** avec le rendement le plus élevé (77%) et le temps de réaction le plus court (entrée 6, Tableau 4).

En résumé, l'addition sur le composé **4** de peracides aliphatiques comportant 4 à 8 atomes de carbone conduit à la formation de deux régio-isomères avec la prévalence d'hydroxyesters portant un groupe hydroxyle primaire (**5c** à **5e**), alors que les peracides à plus longue chaîne (10 à 16 atomes de carbone) ne donnent lieu qu'à la formation du produit de type **5**. A l'exception des réactions avec les peracides éthanoïque et butanoïque, des rendements satisfaisants de l'ordre de 70 à 80% sont obtenus en moins de 24h, dans des conditions réactionnelles relativement douces (40°C). A titre de comparaison et à rendements équivalents, l'estérification ou la transestérification d'acides phénoliques en présence du même catalyseur (Novozyme 435) requièrent des conditions opérationnelles plus sévères, comme des températures plus élevées (50 à 60°C) et un temps de réaction plus long (7 à 30 jours) (Figuerola-Espinoza et Villeneuve, 2005).

De façon inattendue, tous les essais de lipophilisation du canolol silylé **3** se sont avérés infructueux. En effet, dans les mêmes conditions opératoires que celles appliquées au 4-vinylguaïacol et quelle que soit la quantité d'enzyme (10%, 20%, 30%, m/m) aucun produit d'addition n'a été observé après 24 heures de réaction. Par ailleurs, lors de la réaction directe de **3** avec l'acide *mé*ta-chloroperbenzoïque (*m*-CPBA) aucun produit d'addition n'a été observé après 23h, l'essentiel du produit de départ **3** étant toujours présent dans le milieu réactionnel comme l'a confirmé l'analyse par spectrométrie de masse (section II.4 du chapitre 2). L'absence de réaction en présence de Novozyme 435 n'est donc pas liée à une inhibition de l'enzyme par le canolol silylé mais à la réactivité même de la double liaison vinylique de ce dernier. Comparée à celle 4-vinylguaïacol silylé **4**, l'absence de réactivité du canolol silylé **3** indique clairement l'implication du groupement méthoxy supplémentaire en position *mé*ta dans la désactivation de la liaison vinylique. A l'avenir, une étude plus approfondie par modélisation moléculaire devrait permettre de mieux comprendre la réactivité du canolol silylé **3**, et plus généralement celle des composés phénoliques, en présence de peracides.

La section suivante est consacrée à l'évaluation, par la méthode CAT, de l'activité antioxydante des hydroxyesters phénoliques synthétisés à partir du 4-vinylguaïacol.

III.1.2 Evaluation de la capacité antioxydante par la méthode des Triènes Conjugués Autoxydables (CAT)

Dans cette étude, le test CAT a été utilisé pour évaluer la capacité antioxydante des esters phénoliques obtenus à partir du 4-vinylguaiacol **2**. Ce test, est basé sur la dégradation oxydative d'une émulsion d'huile naturelle, l'huile de tung, dans laquelle les triglycérides sont principalement composés d'acide alpha-éléostéarique [(9Z, 11E, 13E)-9,11,13-octadécatriénoïque] (environ 85%). En raison de la présence d'un triène conjugué, cet acide gras absorbe fortement dans l'UV à 273 nm et est très sensible à l'oxydation. Par conséquent, en conditions oxydantes, une dégradation du triène conjugué se traduit par la perte du signal à 273 nm. Ces propriétés permettent une évaluation directe, efficace, et rapide de l'oxydation des lipides dans les systèmes hétérophasiques. Représentatif du phénomène d'oxydation des acides gras insaturés dans les milieux complexes comme les aliments ou les systèmes biologiques (Laguerre *et al.*, 2008) le test CAT est donc un outil pertinent d'évaluation de la capacité antioxydante de molécules diverses.

L'activité antioxydante du 4-vinylguaiacol et des esters phénoliques synthétisés est reportée dans le Tableau 4 (section précédente) et illustrée, en fonction de la longueur de la chaîne alkyle de l'ester, par la Figure 40. De l'examen des résultats, il ressort clairement que l'activité antioxydante des esters phénoliques (i) est significativement différente de celle du 4-vinylguaiacol, (ii) varie de façon non linéaire avec le nombre de carbone de la chaîne alkyle et (iii) dépend du type d'hydroxyle, primaire ou secondaire, porté par l'ester phénolique.

Concernant le dernier point, il est intéressant de constater qu'à nombre égal d'atomes de carbone dans la chaîne alkyle, les isomères à hydroxyle primaire ont une activité antioxydante supérieure à celle des isomères à hydroxyle secondaire. Il est vraisemblable que cette différence soit liée à l'effet inductif négatif (-I) du groupement hydroxyle aliphatique libre qui, lorsqu'il se trouve au plus près du cycle aromatique (cas des isomères à hydroxyle secondaire), perturbe davantage la stabilisation par résonance des radicaux phénoxyles, et se traduit par une capacité antioxydante moindre et une valeur CAT plus faible. Néanmoins, comme cela a été

évoqué au début de ce chapitre, l'activité antioxydante d'une molécule étant liée à sa capacité à se placer préférentiellement à l'interface huile/eau, il n'est pas exclu que les esters phénoliques à hydroxyle primaire aient une meilleure affinité pour l'interface que leurs analogues à hydroxyle secondaire ainsi que des propriétés tensioactives (formation de micelles ou d'agrégats) différentes.

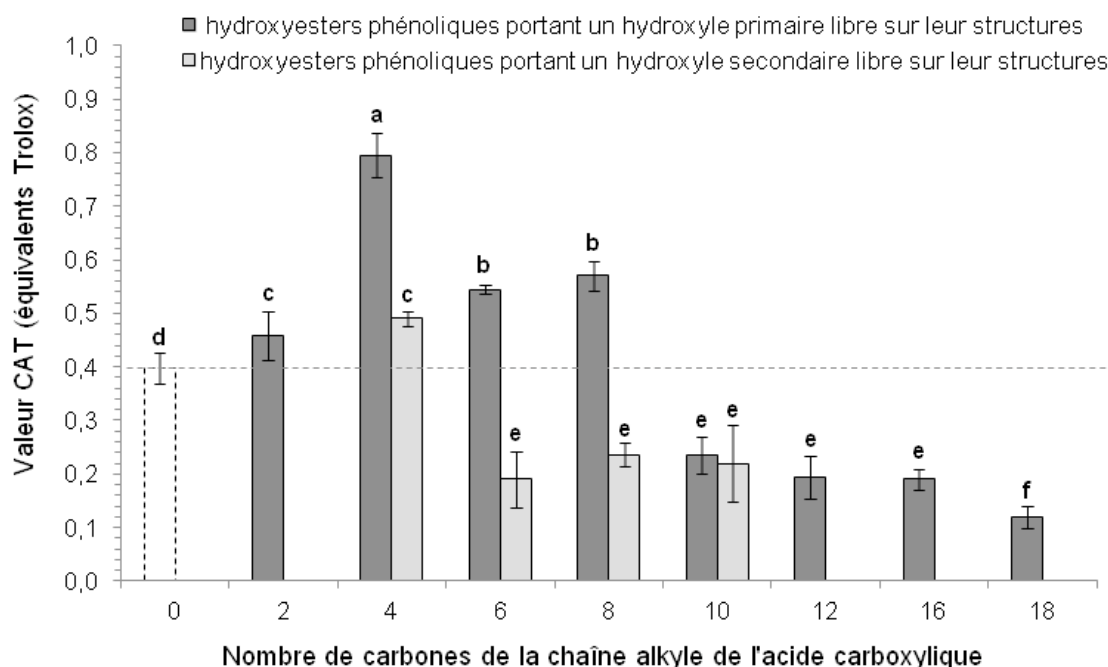


Figure 40. Valeurs CAT du 4-vinylguaiacol (□) et des hydroxyesters phénoliques portant un hydroxyle primaire libre (■) ou un hydroxyle secondaire libre (□). Les valeurs suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, $p \leq 0,05$. Les valeurs sont des moyennes \pm ET ($n = 3$).

En ce qui concerne les esters phénoliques possédant un groupe hydroxyle primaire libre, une amélioration significative de l'activité antioxydante par rapport à celle du 4-vinylguaiacol (valeur CAT de 0.40 ± 0.03) a été observée pour les esters à chaînes alkyles comportant 2, 4, 6 et 8 atomes de carbone [valeurs CAT respectives de 0.80 ± 0.05 (**5a**), 0.49 ± 0.04 (**5b**), 0.55 ± 0.01 (**5c**) et 0.57 ± 0.03 (**5d**)]. A l'inverse, les esters à chaîne alkyle à 10, 12, 16 et 18 atomes de carbone (**5f**, **5g** et **5h**, respectivement) ont montré une capacité antioxydante inférieure à celle du 4-vinylguaiacol avec des valeurs CAT comprises entre 0.12 et 0.24.

En termes de capacité antioxydante, les esters phénoliques à hydroxyle primaire peuvent donc être classés dans l'ordre suivant: C4 (**5b**) > C6 (**5c**) \approx C8 (**5d**) > C2 (**5a**) >> C10 (**5e**) \approx C12 (**5f**) \approx C16 (**5g**) > C18 (**5h**). Cet ordre montre qu'en milieu émulsionné (Test CAT), il existe une relation non linéaire, appelée « effet *cut-off* », entre la longueur de la chaîne alkyle de l'ester phénolique et la capacité antioxydante, comme cela a été mis en évidence par d'autres auteurs avec différentes séries d'esters phénoliques, les chlorogénates, rosmarinales et coumarates d'alkyles (Bayrasy *et al.*, 2013; Laguerre *et al.*, 2009b; Sorensen *et al.*, 2014).

Ces études ont en effet montré que l'activité antioxydante en milieu émulsionné des esters phénoliques augmente avec la longueur de la chaîne alkyle jusqu'à un point critique (correspondant à la *Longueur de Chaîne Critique*, LCC) au-delà duquel toute augmentation de la longueur de la chaîne se traduit par un effondrement de l'activité antioxydante. Pour ces trois séries d'esters phénoliques, l'activité antioxydante optimale a été obtenue pour des longueurs de chaîne alkyle comprises entre 8 à 12 atomes de carbone. En ce qui concerne les deux séries d'esters synthétisées à partir du 4-vinylguaiacol, la capacité antioxydante la plus élevée a été obtenue avec une chaîne alkyle à 4 atomes de carbone.

La réactivité chimique intrinsèque d'un antioxydant vis à vis d'espèces oxydantes, c'est-à-dire sa capacité à céder un électron ou un atome d'hydrogène, n'est pas le seul facteur qui régit son activité, cette dernière étant de nature multifactorielle (Laguerre *et al.*, 2014; Panya *et al.*, 2012).

En milieux multiphasiques, outre la réactivité par rapport aux radicaux libres, la position, la mobilité et la concentration aux interfaces sont autant de paramètres qui vont conditionner l'efficacité d'un antioxydant. Il est maintenant admis que dans de tels systèmes, la lipophilisation affecte principalement les propriétés antioxydantes en modifiant le partitionnement de la molécule dans les différentes phases du milieu mais également ses propriétés tensioactives et d'autoassemblage. Ainsi, suivant sa structure et sa polarité, une molécule pourra « exprimer » ou non sa capacité antioxydante suivant si elle est présente dans la phase aqueuse, la phase lipidique ou la pseudophase intermédiaire (interface) et si elle se trouve sous forme libre, de

micelles ou d'agrégats (Laguerre *et al.*, 2009a). Par conséquent, les hypothèses suivantes peuvent être avancées quant au déterminisme de l'activité antioxydante des esters phénoliques à hydroxyle primaire qui peuvent se répartir en trois groupes distincts.

Pour le premier groupe, représenté par ester éthylique **5a**, la localisation est essentiellement dans la phase aqueuse avec une interaction limitée avec l'interface huile/eau où l'oxydation se produit. La polarité de **5a** est proche de celle du 4-vinylguaïacol et les valeurs CAT sont donc peu différentes (Tableau 4).

L'ester butylique **5b**, correspondant au deuxième groupe, est le dérivé ayant la plus forte affinité pour l'interface où il va se concentrer davantage et contrer plus efficacement l'oxydation lipidique induite par les lipoperoxy radicaux. La valeur CAT est alors maximale.

Dans le troisième groupe, composé des hydroxyesters à chaînes moyennes (6 à 8 carbones) l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle et donc du caractère lipophile, se traduit par une diminution de la concentration des esters dans la phase intermédiaire au profit de la phase lipidique. Dans le même temps, la formation de micelles ou d'agrégats à partir des esters, seuls ou associé au tensioactif de l'émulsion, participe au retour des esters dans la phase aqueuse et à leur éloignement de l'interface. Ces deux phénomènes, qui contribuent à la diminution progressive de l'activité antioxydante et donc des valeurs CAT, s'amplifient avec l'allongement de la chaîne alkyle pour devenir prépondérants dans le dernier groupe constitué des esters d'alkyles les plus lipophiles (chaîne alkyle à 10 atomes de carbone et plus).

III.1.3 Conclusion

La lipophilisation, par la modulation du caractère amphiphile, constitue un moyen efficace d'améliorer l'activité antioxydante des composés phénoliques polaires dans les systèmes lipidiques multiphasiques. Elle concerne principalement les acides phénoliques, benzoïques et hydroxycinnamiques, au travers de réactions

d'estérification ou de transestérification avec des alcools de différentes natures. Ces réactions peuvent être catalysées par des lipases, notamment la lipase B de *Candida antarctica*, dans des conditions sélectives, douces et respectueuses des principes de la chimie verte avec néanmoins comme inconvénient des durées plus longues. Dans cette étude nous avons montré que les vinylphénols pouvaient également servir de substrat pour la synthèse de composés phénoliques amphiphiles au travers d'une réaction d'addition de peracides sur la double liaison vinylique. Dans cette réaction, l'activité perhydrolase de la lipase B de *Candida antarctica* a été mise à profit pour générer *in situ* les peracides, à partir de peroxyde d'hydrogène et d'acides carboxyliques de différentes longueurs de chaîne. Des deux vinylphénols testés, seul le 4-vinylguaiacol a montré une réactivité intéressante, le canolol s'avérant totalement inerte vis-à-vis des peracides. L'addition électrophile des peracides sur la double liaison vinylique au caractère nucléophile marqué du 4-vinylguaiacol a conduit à la formation de deux types d'hydroxyester, l'un à hydroxyle primaire, l'autre à hydroxyle secondaire, dans des proportions variables selon la longueur de la chaîne alkyle des peracides. Globalement, l'augmentation de la longueur de la chaîne alkyle du peracide favorise la formation des esters phénoliques à hydroxyle primaire pour devenir exclusive à partir de 10 atomes de carbone. Dans un deuxième temps, l'activité antioxydante de ces hydroxyesters phénoliques a été évaluée en émulsion (test CAT) et comparée à celle du 4-vinylguaiacol. La série des esters à hydroxyle primaire s'est avérée la plus intéressante avec une amélioration significative de l'activité antioxydante (par rapport au 4-vinylguaiacol) pour les esters à chaîne alkyles comportant 2 à 8 atomes de carbone, le maximum étant obtenu pour 4 carbones. L'évolution non linéaire de la capacité antioxydante en fonction de la longueur de la chaîne alkyle de l'ester avec passage par un optimum (effet « cut-off ») a été également observée en émulsion, confirmant ainsi les travaux antérieurs de différents auteurs.

III.2 SYNTHÈSES DE PRE-POLYMERES EPOXY BIOSOURCES PAR REACTIONS DE DIMERISATION

Initiés dans le cadre d'un projet relatif à la production de résines époxy biosourcées, les travaux présentés dans cette section visent à étudier la possibilité de synthétiser

des dimères phénoliques ayant une structure chimique proche de celle de l'éther diglycidyle de bisphénol-A (DGEBA) à partir de ressources renouvelables. De par leur similitude structurelle, les molécules synthétisées devraient conduire à des propriétés thermomécaniques assez similaires à celle attribuées au DGEBA. L'éther diglycidyle du bisphénol-A (DGEBA), issu de la condensation du bisphénol A (BPA) et de l'épichlorohydrine, est le pré-polymère le plus couramment utilisé dans les formulations de résine époxy (Jain *et al.*, 2003) et il est estimé qu'environ 75% des résines époxy présentes sur le marché sont produites à partir de ce pré-polymère.

Dans un contexte où la recherche d'alternatives au bisphénol A et ses dérivés est devenue un enjeu majeur et dans le but de synthétiser des précurseurs époxy à partir de ressources renouvelables, la synthèse de dimères aromatiques a été envisagée selon deux voies distinctes: d'une part la métathèse croisée (MC), c'est à dire la dimérisation des composés **1**, **2** et **8** et, d'autre part, la dimérisation de l'eugénol **8** par O-alkylation avec le 1,5-dibromopentane suivie de l'époxydation chimio-enzymatique des doubles liaisons allyliques du dimère obtenu.

III.2.1 Dimérisation par métathèse croisée

Les composés phénoliques naturels choisis pour cette étude sont le canolol **1**, le 4-vinylguaiacol **2** et l'eugénol **8** (Figure 41). Les caractéristiques générales du canolol et du 4-vinylguaiacol ont été décrites précédemment (section III.3.3 du chapitre 1, et section III.1 du chapitre 3).

L'eugénol (2-méthoxy-4-(2-propényl)-phénol), sous forme libre ou d'acétate, est le principal constituant de l'huile essentielle de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) (>80%, m/m). Il est utilisé pour ces propriétés médicinales, mais aussi comme agent de flaveur et de conservation des aliments (Hyun-Hee *et al.*, 2011; Olmedo *et al.*, 2015; Raja MRC, 2015). L'eugénol naturel (il peut être également synthétisé par réaction du guaiacol avec le chlorure d'allyle) est extrait de l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles, des bourgeons et des tiges de girofliers par distillation à la vapeur d'eau ou par extraction au Soxhlet avec de l'éthanol. Produit peu coûteux (≈

4.5 €·kg⁻¹, (Kaufman, 2015) et commercialement disponible, l'eugénol est un antimicrobien naturel avec des propriétés analgésiques légères. Il est couramment utilisé comme parfum et agent aromatisant dans une variété de produits cosmétiques et certains produits alimentaires. En outre, ce produit naturel possède d'autres activités biologiques intéressantes, notamment antioxydante, anti-inflammatoire, antiseptique, antispasmodique, antidépressive, antigénotoxique et anticarcinogénique (Kaufman, 2015; Olmedo *et al.*, 2015). L'eugénol est aussi utilisé en chirurgie dentaire, sous la forme d'eugénate, pour des pansements et pour l'obturation des canaux dentaires. La structure particulière de l'eugénol et sa large disponibilité en font un produit naturel très intéressant dans les formulations chimiques où il constitue l'un des produits de départ pour la synthèse de certains composés bioactifs naturels, d'esters, d'hétérocycles, de macrocycles et de polymères (Kaufman, 2015).

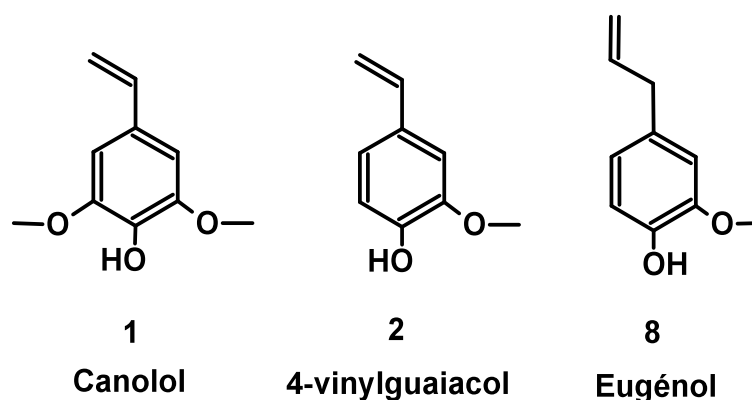


Figure 41. Structures chimiques de **1**, **2** et **8**.

Outre le fait d'être accessibles à partir de ressources renouvelables, les composés **1**, **2** et **8** présentent l'intérêt d'avoir des différences structurales dont les effets peuvent être étudiés dans les réactions mises en jeu. Ainsi, les éventuelles différences de réactivité entre le canolol **1** et le 4-vinylguaiacol **2** pourront être mises en relation avec la présence d'un groupement méthoxy supplémentaire en position méta, tandis qu'entre le 4-vinylguaiacol **2** et l'eugénol **8**, elles pourront être liées au caractère conjugué ou non des doubles liaisons vinyliques et allyliques avec le cycle aromatique.

III.2.1.1 Etude préliminaire : définition des conditions de synthèse

Dans un premier temps, la stratégie de synthèse des dimères diglycidylés à partir des composés phénoliques cités ci-dessus, a consisté en: i) la dimérisation des composés **1**, **2** et **8** par réaction de métathèse croisée, puis ii) l'allylation alcaline des groupements hydroxyle phénoliques des dimères résultants, et enfin iii) l'époxydation chimio-enzymatique des doubles liaisons O-allyliques introduites en groupements oxiranes.

La dimérisation des composés **1**, **2** et **8** en présence du catalyseur de Grubbs II ($C_{46}H_{65}Cl_2N_2PRu$) a d'abord été étudiée. Chacun des ces composés a été dissous dans du dichlorométhane en présence de 5% (en moles) de catalyseur, tel que décrit dans la partie expérimentale et représenté sur la Figure 42.

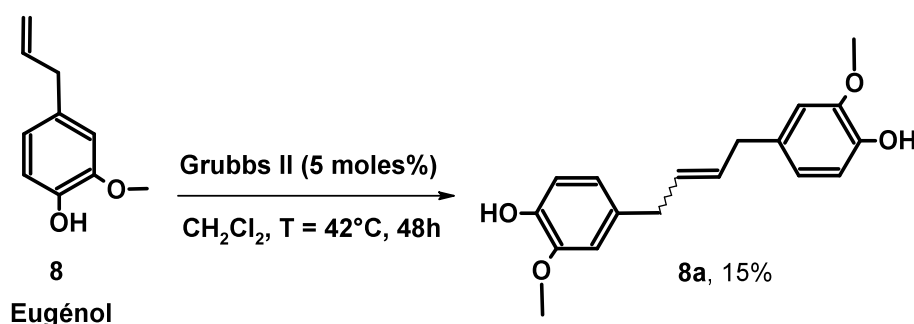


Figure 42. Métathèse croisée du composé **8**.

Dans ces conditions et à partir de l'eugénol, le dimère **8a** a été obtenu avec un rendement faible de 15%. Une quantité non négligeable de produits inconnus (impossible à caractériser) a été également produite. Dans le cas des composés vinyliques **1** et **2**, aucun produit de dimérisation n'a été observé. Seuls des produits colorés de structure inconnue et très peu solubles dans les solvants organiques usuels ont été obtenus.

Afin d'expliquer ces résultats, il faut se reporter au mécanisme de la réaction de métathèse croisée, et plus particulièrement aux interactions entre le métal et les substrats comportant des hydroxyles. Il est rapporté en effet qu'en présence d'alcool,

les complexes de ruthénium catalysent respectivement la réduction des cétones saturées et insaturées en alcools secondaires et en cétones saturées, les alcools jouant le rôle de source d'hydrogène (Gladiali et Mestroni, 1998; Schmidt, 2004). Dans le mécanisme de transfert d'hydrogène, les complexes chlorés de ruthénium peuvent former des complexes alkoxydes en s'associant avec les alcools primaires (Figure 43).

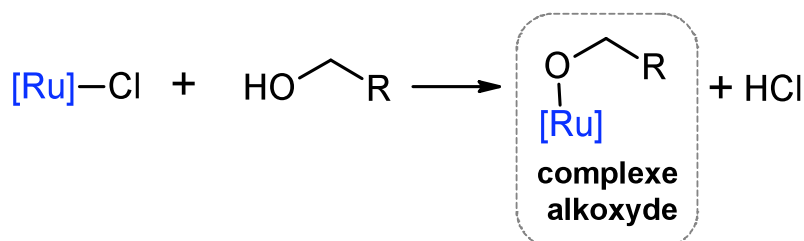


Figure 43. Transformation du chlorure de ruthénium en complexe alkoxyde.

Cette transformation est facilitée par l'addition d'une base qui augmente la labilité du proton du groupement hydroxyle de l'alcool. Dans le cas des composés phénoliques, et particulièrement des composés **1** et **2**, l'effet mésomère donneur induit par le groupement vinyle renforce la charge négative sur l'atome d'oxygène et accroît la labilité du proton hydroxyle. L'attraction entre le ruthénium et les composés phénoliques se trouve renforcée, permettant ainsi la formation des complexes alkoxydes (Figure 43). D'autre part, en fonction de la configuration du complexe alkoxyde, un phénomène de recouvrement p-p entre les cycles aromatiques du catalyseur de ruthénium et ceux des composés phénoliques peut se produire. Par conséquent, les produits inconnus résultant de la réaction du catalyseur de Grubbs II avec les composés **1**, **2** ou **8** semblent être des homologues du complexe alkoxyde de ruthénium. D'après ces observations, il est raisonnable de penser que les groupements hydroxyles phénoliques libres des composés **1**, **2** et **8** soient à l'origine de cette réactivité particulière vis à vis du catalyseur de Grubbs. Afin de confirmer l'implication des groupes hydroxyles phénoliques dans ce mécanisme de complexation, l'hydroxyle phénolique libre du composé **2** a été méthylé par étherification avec de l'iodure de méthyle en présence de carbonate de potassium. La métathèse du produit brut obtenu a été ensuite réalisée à 42°C en présence du catalyseur de Grubbs II (5% en moles) (Figure 44).

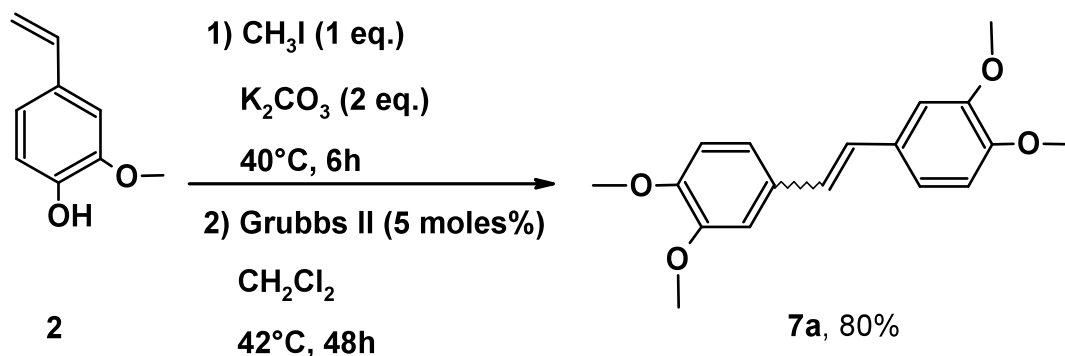


Figure 44. Protection de l'hydroxyle phénolique du composé **2** par O-méthylation suivie de la réaction de métathèse croisée.

Au bout de 48 heures de réaction, le dimère **7a** a été obtenu avec un rendement de 80%, et sa structure confirmée par RMN ^1H (section II.5, chapitre 2). L'éthérification de l'hydroxyle phénolique a été établie par l'absence du signal caractéristique du proton de l'hydroxyle phénolique (à 9,06 ppm) et l'apparition d'un singulet à 3.82 ppm. De plus, les signaux à 5.04 à 6.65 ppm (système ABX) qui caractérisent le groupement vinyle ont disparu et ont été remplacé par un signal à 7.07 ppm, relatif à la double liaison substituée.

Ce résultat démontre clairement que la désactivation du catalyseur par formation de complexes alkoxydes et de produits indésirables est induite par les groupements hydroxyles libres des composés phénoliques, phénomène d'autant plus important que le cycle aromatique est conjugué avec une double liaison comme dans le cas des vinylphénols **1** et **2**. La protection préalable de l'hydroxyle phénolique s'avère donc indispensable au succès de cette réaction de métathèse croisée avec de tels substrats. Pour cela, nous avons choisi la réaction de glycidylation, qui consiste à substituer les protons hydroxyles phénoliques par des groupements méthyloxirane. Elle présente en effet le double avantage de protéger les groupements hydroxyles et d'introduire les groupements fonctionnels époxy désirés. Nous avons donc modifié notre stratégie initiale en effectuant la réaction de métathèse croisée sur les composés **1**, **2** et **8** préalablement glycidylés à l'aide de l'épichlorohydrine (Figure 45).

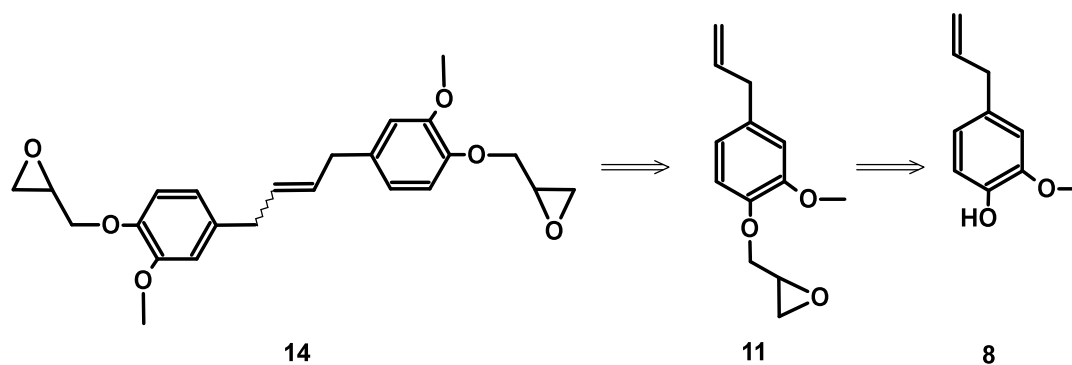


Figure 45. Schéma de rétrosynthèse du dimère diglycidylé de l'eugénol. La même voie a été utilisée pour la dimérisation des dérivés glycidylés de **1** et **2**.

III.2.1.2 Glycidylation du canolol **1**, du 4-vinylguaïacol **2** et de l'eugénol **8**

En se basant sur des études antérieures de l'équipe et portant sur la production de polymères époxy biosourcés (Aouf *et al.*, 2012; Nouailhas *et al.*, 2011), la réaction de glycidylation des composés **1**, **2** et **8** a été réalisée à l'aide d'épichlorohydrine en milieu alcalin et en présence d'un catalyseur de transfert de phase, le chlorure de benzyltriéthylammonium (BnEt_3NCl), telle que décrite dans la partie expérimentale et représentée sur la

Figure 46.

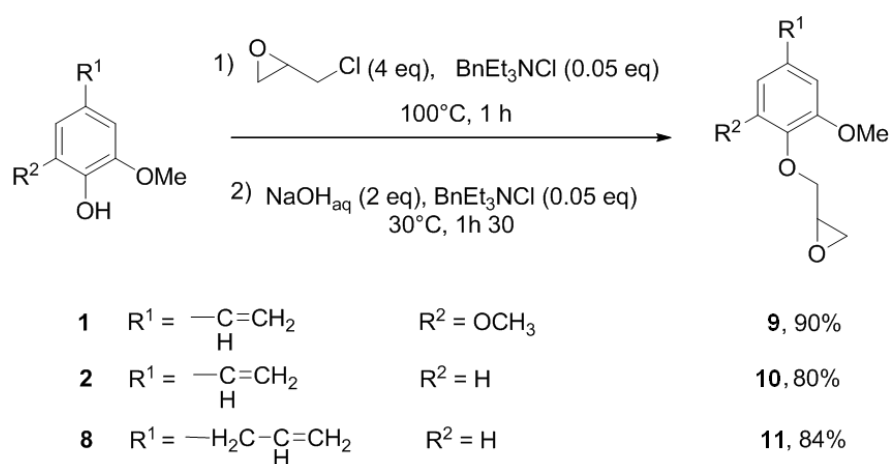


Figure 46. Réactions de glycidylation des composés **1**, **2** et **8**.

Dans ces conditions, les composés **1**, **2** et **8** ont respectivement conduit aux dérivés glycidylés **9**, **10** et **11**, avec des rendements après purification compris entre 80 et 90%.

III.2.1.3 Métathèse croisée des produits de glycidylation du canolol **9**, du 4-vinylguaiaicol **10** et de l'eugénol **11**

L'homodimérisation par métathèse croisée (MC) des dérivés glycidylés **9**, **10** et **11** a été réalisée en présence de catalyseur de Grubbs II (5% en mole) dans le dichlorométhane, à 45°C pendant 48 h. Afin de produire une large gamme de dimères aromatiques, les réactions de métathèse croisée de **9** avec **10**, **9** avec **11** et **10** avec **11** ont également été réalisées dans les mêmes conditions opératoires. Les produits résultants de ces réactions sont présentés dans le Tableau 4 et sur la Figure 47.

Tableau 5. Métathèse croisée des dérivés glycidylés **9**, **10** et **11**.

Entrée	Monomères	Produits de métathèse		Rendement ^a (%)
		Homodimères	Hétérodimères	
i	11	14		56
		13		10
			17	14
ii	10	13		76
iii	9	12		78
iv	10+11	13		44
		14		10
			17	36
v	9+11	14		16
		12		16
			16	48
			15	5
vi	9+10	12		33
		13		24
			15	30

^a Rendement en produit pur, après chromatographie sur gel de silice.

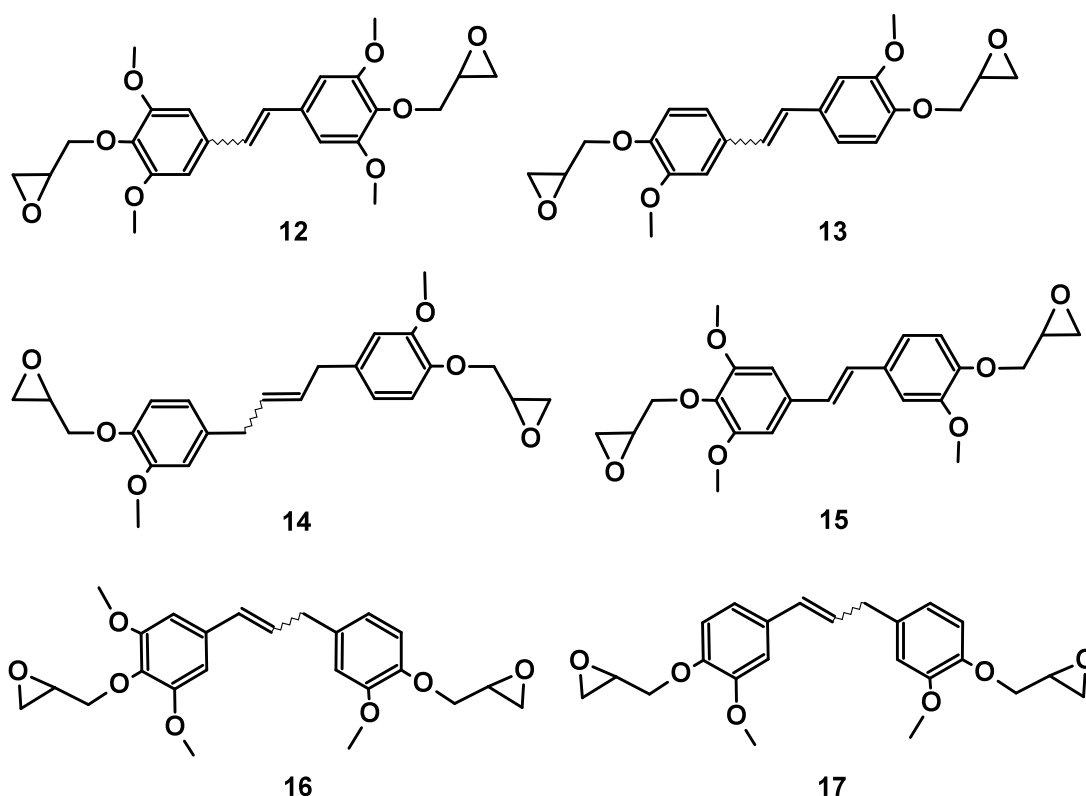


Figure 47. Produits obtenus par métathèse croisée des composés **9**, **10** et **11**.

Comme montré sur la Figure 47, trois types de liaisons résultent des réactions de MC de **9**, **10** et **11**: la liaison « allyle-allyle » (composé **14**), la liaison « vinyle-vinyle » (composés **12**, **13** et **15**) et la liaison « vinyle-allyle » (composés **16** et **17**).

Selon le type de liaison, les signaux de RMN ¹H des protons oléfiniques (H7 et H8) présentent différents déplacements chimiques (Figure 48). La caractérisation structurale de tous les dimères a été réalisée à partir de plusieurs analyses RMN 1D et 2D, ce qui a permis l'attribution de tous les protons et carbones. Les analyses ont montré que, pour chaque dimère, un seul isomère E ou Z a été formé car un seul ensemble de signaux a pu être observé. La détermination de la configuration relative de la double liaison n'a été possible que pour des dimères **15** et **17** pour lesquels les constantes de couplage des protons oléfiniques ont été égales à ~16 Hz, une valeur caractéristique d'une configuration E. Dans les molécules **12**, **13** et **14**, les protons oléfiniques sont chimiquement et magnétiquement équivalents, ce qui a empêché la mesure de leurs constantes de couplage oléfiniques et, par conséquent, la détermination de la configuration géométrique de la double liaison. Dans le cas du dimère **16**, bien qu'il s'agisse d'une molécule asymétrique, les signaux des protons

oléfiniques se chevauchent, ce qui empêche la mesure de leur constante de couplage et par conséquent la détermination de la configuration de la double liaison. Selon les études par modélisation de Bahri-Laleh *et al.* (2011), les E-isomères sont majoritairement formés dans la réaction de métathèse d'oléfines en présence de catalyseur au ruthénium. Leurs travaux démontrent que d'un point de vue énergétique (états de transition), la formation des complexes métal/isomères Z est plus favorable, mais que ces derniers se transforment graduellement en complexes métal/isomères E, plus stables. Cependant les alcènes de configuration E ont tendance à se détacher beaucoup plus facilement du métal à la fin de la réaction (comparés aux isomère Z) ce qui suggère que les isomères Z demeurent associés au métal jusqu'à ce qu'ils se convertissent en isomères E avant de retourner dans le milieu réactionnel. Au vu de ce qui précède et étant donné que les molécules asymétriques se sont révélées être de configuration E ; nous pouvons supposer que tous les dimères formés ont adopté cette configuration.

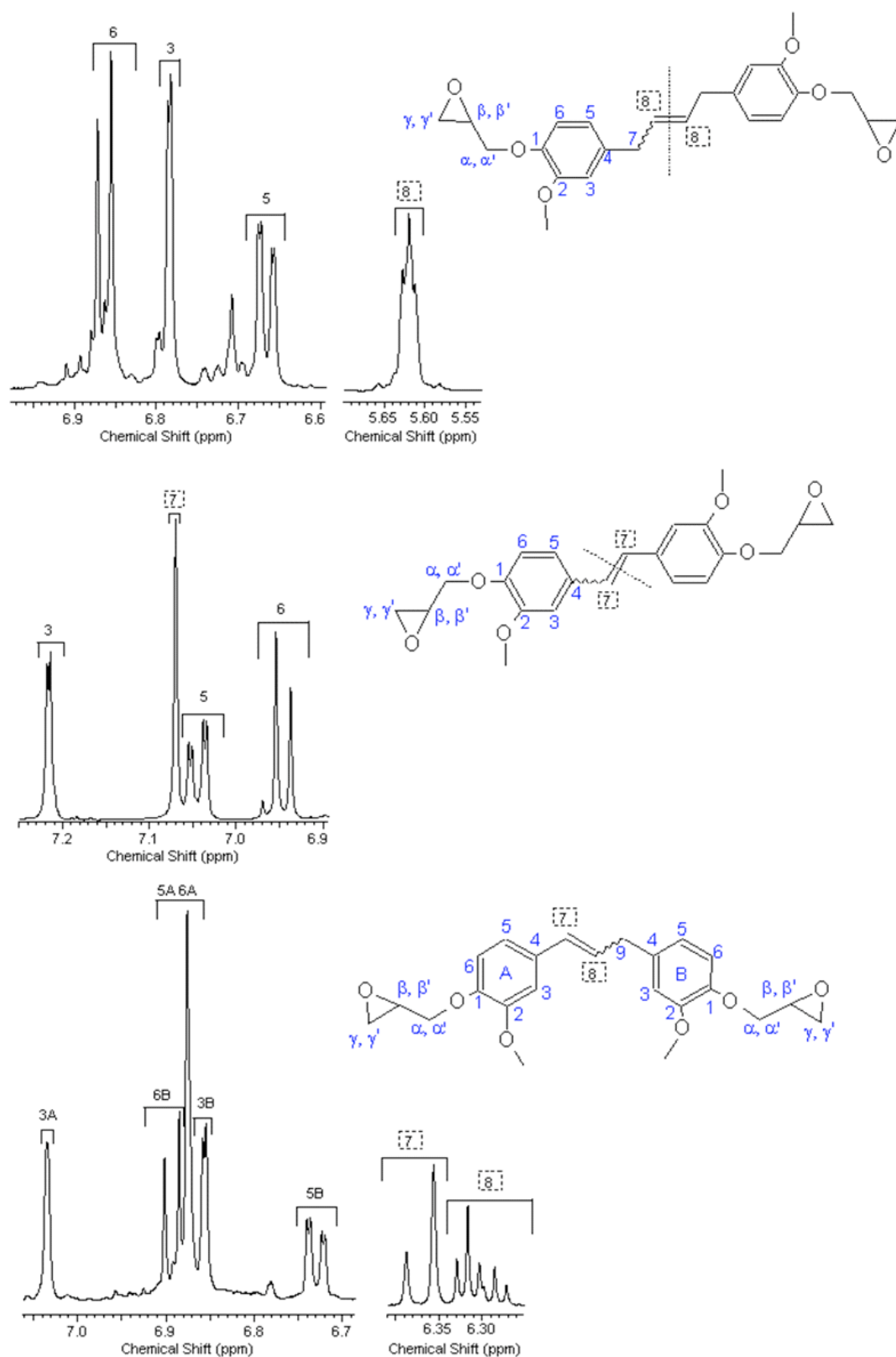


Figure 48. Les spectres RMN ^1H des composés de 14, 13 et 17 illustrant les signaux de liaisons oléfiniques.

La dimérisation par métathèse de **9** et **10** a respectivement conduit aux produits aromatiques diglycidylés **12** et **13**, avec des rendements presque équivalents de 76% et 78%, respectivement (entrées ii et iii, Tableau 4). Dans le cas du composé **11** (entrée i, Tableau 4), la réaction de métathèse a donné en plus de l'homodimère attendu **14** (rendement de 56%), d'autres dimères identifiés comme étant **13** et **17**. La formation de ces deux dimères a été attribuée à l'isomérisation partielle de la double liaison du composé **11**. Il est en effet bien connu que les catalyseurs au ruthénium peuvent isomériser les doubles liaisons (Courchay *et al.*, 2003; Lehman *et al.*, 2003). Le mécanisme conduisant à la formation de l'espèce de ruthénium-hydrure responsable de cette isomérisation a été décrit en détail par Schmidt (Schmidt, 2004) et présenté dans la Figure 49.

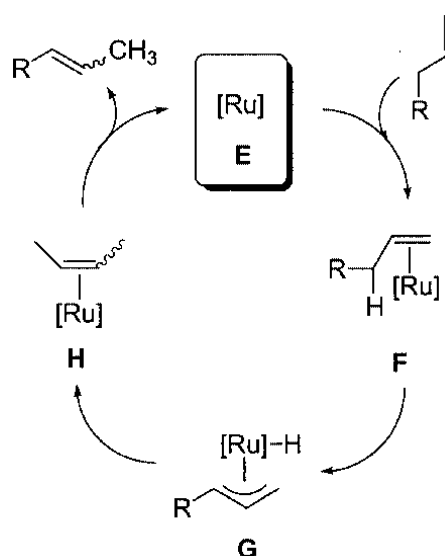


Figure 49. Mécanisme d'isomérisation d'un alcène en présence de ruthénium via formation de complexes d'hydrure de π -allyle (d'après (Schmidt, 2004)).

Ce mécanisme implique la coordination de la double liaison de l'oléfine avec le complexe de ruthénium **E** pour former l'espèce **F**. L'intermédiaire **G**, résulte de la migration d'un hydruure de la position allylique de l'alcène vers le métal. Une élimination réductive conduit au complexe **H**, à partir duquel, le substrat se dissocie pour régénérer l'espèce catalytique **E**.

En outre, cette activité d'isomérisation n'est pas spécifique au ruthénium et peut être catalysée par plusieurs métaux de transition (Morrill et D'Souza, 2003). Dans le cas

du composé **11**, l'action du catalyseur au ruthénium associée au système conjugué créé par la migration de la double liaison, favorise la conversion partielle de **11** en **11a** (Figure 50). L'homodimérisation de **11a** conduit alors à la formation du produit **13** tandis que la réaction de **11** et **11a** produit le biphényle **17**. Dans les deux cas, les molécules de prop-1-ène sont libérées.

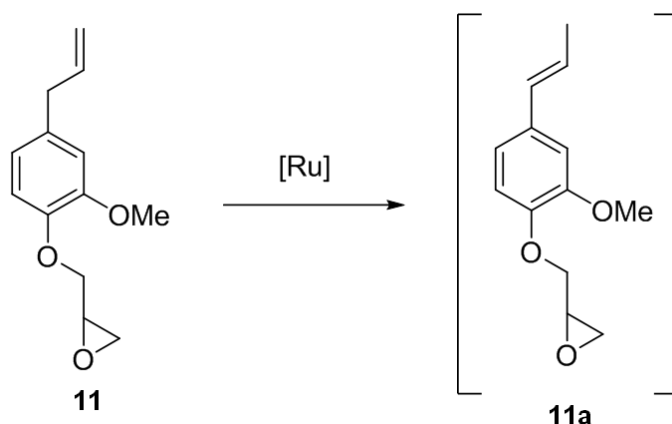


Figure 50. Isomérisation partielle de **11** en **11a**, en présence du catalyseur de Grubbs II (Ru-catalyseur).

Malgré cette réaction secondaire, le produit **14** a été obtenu avec un rendement plus élevé par rapport aux dimères **13** (10%) et **17** (14%), ce qui indique que la réaction de dimérisation se produit plus rapidement que la migration de la double liaison.

Outre l'homodimérisation de **9**, **10** et **11**, chaque composé glycidylé a réagi avec l'autre dans les conditions de métathèse citées précédemment. Généralement, la métathèse croisée de deux alcènes différents conduit à la formation de trois molécules: l'hétérodimère souhaité ainsi que les deux homodimères. Ceci a pu être vérifié au cours de la réaction de métathèse de **9** avec **10** (entrée vi), conduisant à l'hétérodimère **15** avec un rendement de 30% et aux homodimères **12** et **13** avec des rendements respectifs de 24% et 33%. Le rendement plus élevé de l'homodimère **12** (33%) par rapport à l'homodimère **13** (24%) suggère une réactivité supérieure de **9** par rapport à **10**. En effet, si ces deux composés avaient la même réactivité, les homodimères **12** et **13** représenteraient chacun en théorie un quart des produits formés, l'hétérodimère **15** constituant l'autre moitié. Cette différence de réactivité est vraisemblablement due au groupement méthoxy supplémentaire en position méta du composé **9**.

La métathèse croisée de **10** et **11** (entrée iv) a conduit aux composés **13**, **14** et **17** avec des rendements respectifs de 44%, 10% et 36%, c'est à dire les mêmes que ceux obtenus lors la réaction d'homodimérisation de **11**. Le fait que l'homodimère **13** a été formé majoritairement peut s'expliquer par l'augmentation de la proportion de composés vinyliques issus l'isomérisation du composé **11** dans le milieu réactionnel.

Enfin, avec un rendement de 48%, l'hétérodimère **16** s'est avéré le produit majoritaire de la réaction de métathèse croisée de **9** et **11**. Les homodimères **12** et **14** ont aussi été obtenus, dans des quantités égales (rendement de 16% pour chaque produit). La formation majoritaire de l'hétérodimère **16** est en accord avec les données de la littérature qui montrent que la métathèse croisée d'alcènes portant des groupements allyliques (ou des chaines alkyles plus longues) forme principalement des produits asymétriques (Forget-Champagne *et al.*, 2001). D'autre part, le phénomène d'isomérisation ne semble pas très important dans ce cas. En effet, le dimère **15** a été formé avec un rendement très faible (5%) et le produit résultant de la réaction de **11** avec **11a** (composé **17**) n'a pas été observé.

En résumé, l'homodimérisation des dérivés glycidylés **9**, **10** et **11** a conduit à la formation des dimères symétriques correspondants **12**, **13** et **14**, avec de bons rendements et une haute diastéréosélectivité. Au cours de la MC du composé **11** l'isomérisation de la double liaison a eu lieu, conduisant à la production de l'hétérodimère **17**. En couplant le composé **9** avec **10** ou **11**, deux nouveaux dimères (**15** et **17**, respectivement) ont été obtenus avec des rendements équivalents. Dans la plupart des cas, les réactions de MC ont conduit à des mélanges de dimères. Ceci ne constitue pas un obstacle pour la formulation des résines époxy ni pour les propriétés de ces dernières, les structures des dimères obtenus étant relativement proches. Néanmoins, si la synthèse de substituts potentiels au DGEBA par métathèse croisée de l'eugénol, du canolol et du 4-vinylguaiacol a pu être démontrée ici, des études complémentaires devront être menées pour évaluer, d'une part, la toxicité des molécules obtenues et, d'autre part, la faisabilité de leur mise en œuvre dans les résines époxy.

Dans l'optique d'élargir la gamme de composés de substitution du bisphénol-A et ses dérivés, une autre voie de dimérisation, basée sur la dimérisation par O-alkylation

suivie de l'époxydation chimio-enzymatique des doubles liaisons, a été étudiée avec l'eugénol comme substrat modèle. Les résultats de cette étude sont présentés dans la section suivante.

III.2.2 Synthèse de dimères glycidylés de l'eugénol par O-alkylation avec le dibromopentane et époxydation des doubles liaisons allyliques

Cas particulier de la réaction de synthèse des éthers de Williamson, la O-alkylation des composés phénoliques se base sur la forte nucléophilie des ions phénolates aisément générés par l'action d'une base comme le carbonate de potassium. Cette réaction, de type S_N2 en présence d'halogénures d'alkyle primaires, est mise en œuvre dans des solvants aprotiques dipolaires comme le DMSO ou le DMF, ces derniers ayant la particularité d'accélérer la réaction par la solvatation du contre-ion et le renforcement du caractère nucléophile de l'oxygène.

En présence de α,ω -dihalogénoalcane, la réaction conduit à la formation de diéther phénoliques et constitue la deuxième voie d'accès aux dimères phénoliques à laquelle nous nous sommes intéressés.

Pour cette voie de dimérisation, seul l'eugénol **8** a été retenu, les vinylphénols **1** et **2** ne pouvant conduire aux produits époxydés désirés pour les raisons évoquées précédemment (voir partie lipophilisation, section III.1, chapitre 3).

La réaction (Figure 51) a été réalisée en milieu alcalin (K₂CO₃) avec l'eugénol **8** et du 1,5-dibromopentane en excès afin de limiter le produit de mono-substitution. Après 48h à 25°C, le dimère **18** a été obtenu comme produit unique, avec un rendement final de 70% après purification.

L'époxydation chimio-enzymatique des doubles liaisons allyliques du dimère **18** a ensuite été réalisée selon la réaction de Prilezhaev, en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de la lipase B de *Candida antarctica* sous forme immobilisée (Nonyzyme 435). En effet, grâce à son activité perhydrolase, cette enzyme en

présence de peroxyde d'hydrogène est capable de convertir des acides gras saturés ayant de 4 à 22 atomes de carbone en leurs peracides correspondants, comme décrit en section IV.2.2.2 (chapitre 1) (Bjorkling *et al.*, 1992).

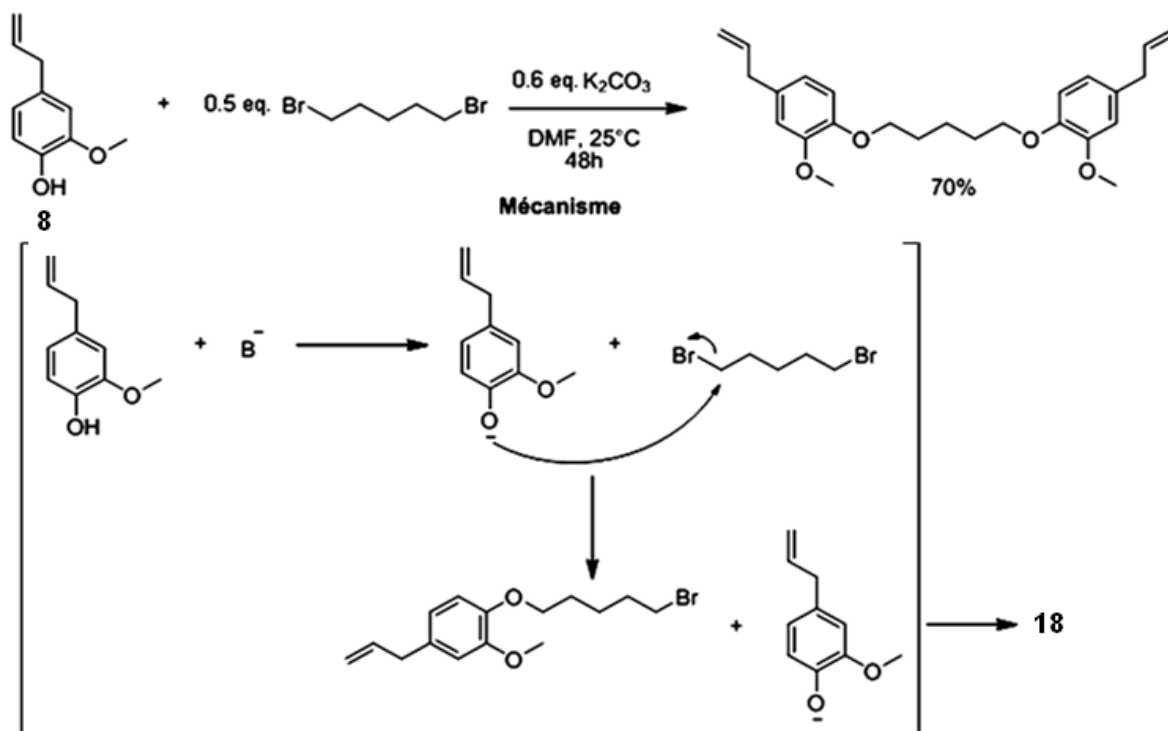


Figure 51. Réaction de O-alkylation de l'eugénol **8** avec le 1,5-dibromopentane.

L'époxydation non catalytique des doubles liaisons est ensuite assurée par les peracides précédemment formés selon le mécanisme classique proposé par Bjorkling *et al.* (1990) est représenté sur la Figure 52.

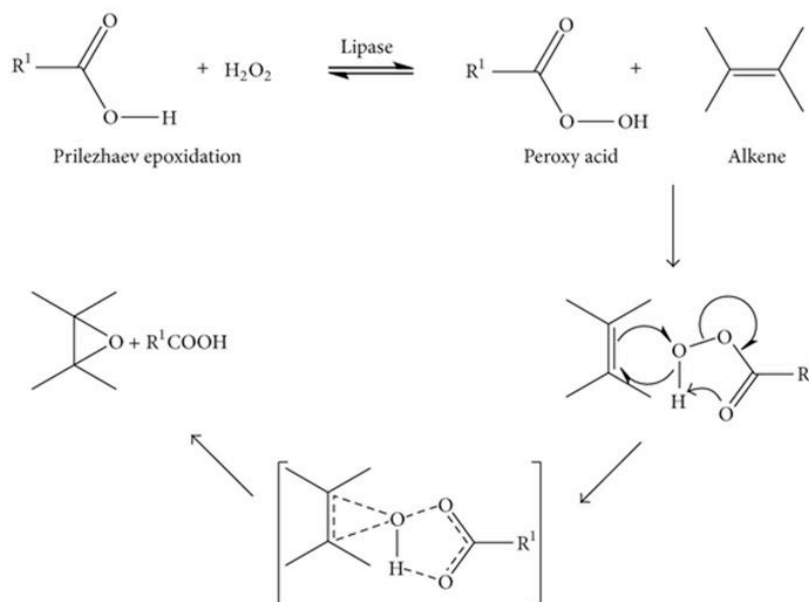


Figure 52. Mécanisme de la réaction d'époxydation de Prilezhaev en présence de peracides générés *in situ* par une lipase (d'après Abdulmalek *et al.* (2014)).

En se basant sur des travaux précédents de l'équipe dans lesquels des composés phénoliques O-allylés ont été époxydés en présence de Novozyme 435 (Aouf *et al.*, 2012), le toluène a été choisi comme solvant, l'acide octanoïque (C8) comme transporteur d'oxygène actif et le peroxyde d'hydrogène comme donneur d'oxygène (Figure 53). L'action du peracide octanoïque généré *in situ* a conduit au dérivé diepoxydé **19** avec un bon rendement (78%). Il est intéressant de noter que le produit mono-époxydé n'a pas été formé, ce qui illustre la grande réactivité des doubles liaisons allyliques de **18** en présence du peracide octanoïque.

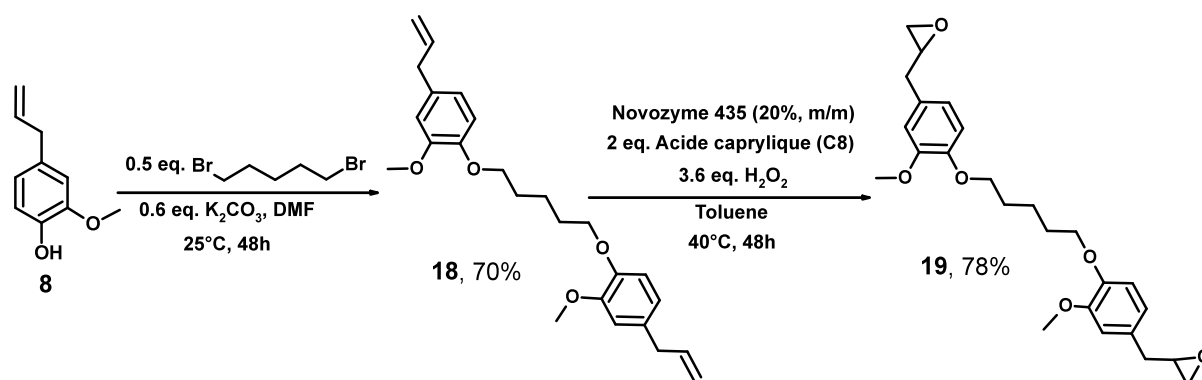


Figure 53. Synthèse chimio-enzymatique du dimère **19**.

III.2.3 Conclusions

Le but de cette étude était de fournir es stratégies synthétiques simples et polyvalentes pour la production de dimères phénoliques diglycidylés à partir de ressources renouvelables. La glycidylation du canolol **1**, du 4-vinylguaiaacol **2** et de l'eugénol **8** avec l'épichlorohydrine suivie de la réaction de métathèse croisée des dérivés glycidylés a converti les trois composés phénoliques naturels en un ensemble de dimères homo- et hétéro-phénoliques (**12-17**) avec un bon rendement et une haute diastéréosélectivité. D'autre part, la réaction de l'eugénol avec le 1,5-dibromopentane a conduit au dimère diallylique **18**, transformé ensuite en produit diepoxydé **19** à travers l'époxydation catalysée par la lipase B de *Candida antarctica*.

Ces deux voies de synthèse ont été réalisées en présence de catalyseurs dans des conditions douces, répondant ainsi aux concepts de la chimie verte. Les trois composés phénoliques glycidylés choisis ont pu servir de substrats pour la réaction de métathèse croisée. Les dimères obtenus à partir de cette réaction sont différemment substitués et possèdent une double liaison dans leur structure chimique. Cette dernière peut être fonctionnalisée de diverses manières, ce qui ouvre la voie à plusieurs possibilités d'application. La fonctionnalisation chimio-enzymatique de l'eugénol a donné lieu à un dimère diglycidylé de structure différente par rapport à la réaction de MC. En modifiant la longueur de la chaîne de l'halogénure d'alkyle, une variété de dimères époxydés offrant des propriétés mécaniques différentes pourrait être synthétisée.

Dans tous les cas, les dimères biosourcés synthétisés comprennent deux cycles aromatiques portant chacun un groupe méthyle oxirane, ce qui fait de ces molécules de bons candidats pour la substitution du DGEBA.

Conclusion Générale et Perspectives

IV. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette dernière décennie a connu un fort développement des cultures oléagineuses en Europe et plus particulièrement en France où le colza est la plus importante d'entre elles avec près de 5Mt de graines produites à des fins alimentaires (huile, protéines) et non alimentaires (biodiesel, oléochimie). Cela s'est traduit par une hausse de la production de tourteaux de colza permettant de répondre en partie aux besoins en protéines de l'alimentation animale et de réduire les importations de tourteaux de soja. L'autre intérêt du tourteau de colza réside dans sa forte teneur en composés phénoliques, essentiellement des esters d'acide sinapique (sinapoylcholine, sinapoylglucose) mais également du canolol (4-vinylsyringol) formé à partir des précédents. Ce vinylphénol, de part sa structure et sa réactivité, constitue une molécule plateforme intéressante pour la production de composés antioxydants amphiphiles et de précurseurs de résines époxy, potentiels substituts de DGEBA (diglycidyl éther de bisphénol-A). Les travaux réalisés s'inscrivent donc dans un contexte global de durabilité des filières avec (i) la mise en application des concepts de bio-raffinerie et de chimie verte, (ii) et la création de valeur ajoutée à des coproduits par la synthèse de nouvelles substances fonctionnelles biosourcées.

La première partie de cette thèse a concerné l'étude de l'impact de différents traitements industriels appliqués aux tourteaux de colza, sur la teneur en composés phénoliques, et plus particulièrement celle du canolol. Les paramètres suivants ont été étudiés : (i) le temps d'incubation après hydratation: 0, 2 et 18 heures et (ii) les traitements thermiques : standard, avec (160°C) ou sans (105°C) vapeur surchauffée - ou par micro-ondes, avec (180°C) ou sans (160°C) vapeur surchauffée. Quel que soit le temps d'incubation, l'hydratation du tourteau n'a eu aucune influence significative sur la teneur en composés phénoliques totaux des échantillons traités par cuisson standard (CS et CSVS), ce qui suggère que l'hydrolyse par les enzymes endogènes n'a pas eu lieu. En revanche, ce traitement a eu un effet positif mais non proportionnel sur les teneurs en sinapine, acide sinapique et canolol lors des traitements assistés par micro-ondes (CMO et CMOVS). Enfin, indépendamment du traitement, seule une partie de l'acide sinapique initialement présent dans le tourteau, ou formé pendant les processus testés, a été converti en canolol. La

température du traitement ainsi que le temps d'exposition appliqués à l'échantillon sont apparus comme des facteurs déterminants dans la formation du canolol (une molécule particulièrement sensible à la température et à l'oxydation) mettant en lumière l'avantage du traitement par micro-ondes. Finalement, une optimisation de la production de canolol par le traitement micro-ondes de tourteaux préalablement hydratés peut être envisagée en portant une attention particulière au temps d'exposition. Une application de traitements d'hydrolyse et de décarboxylation par des enzymes (hydrolases et décarboxylases) directement sur l'extrait phénolique des tourteaux pourrait être envisagée afin de produire des quantités plus importantes de canolol.

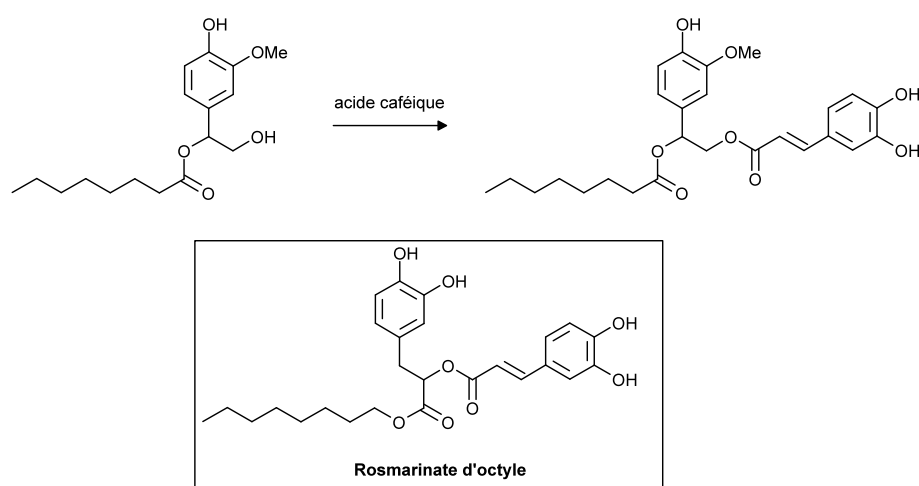
La deuxième partie de la thèse a été consacrée à la synthèse de composés antioxydants amphiphiles à partir du canolol et du 4-vinylguaïacol et l'évaluation de leur l'activité antioxydante. En effet, ces composés connus essentiellement pour leur activité antioxydante, ont une polarité susceptible de limiter leur utilisation ainsi que leur efficacité dans des formulations lipidiques complexes. Afin de contourner cette difficulté, leur lipophilisation par addition électrophile de peracides sur leur double liaison vinylique a été envisagée. Dans cette réaction, les peracides ont été générés *in situ* par la perhydrolyse d'acides carboxyliques aliphatiques de différentes longueurs de chaîne (2 à 18 atomes de carbone) catalysée par la lipase B de *Candida antarctica* en présence de peroxyde d'hydrogène. Alors que le canolol s'est avéré inactif vis-à-vis des peracides, le 4-vinylguaïacol a conduit à la formation quantitative (rendements globaux compris entre 70% et 80% pour les acides à 4-16 carbones) de deux types d'hydroxy-esters (à hydroxyle primaire ou secondaire), l'isomère à hydroxyle primaire libre étant prépondérant, voire exclusif dans le cas des peracides à plus de 8 carbones. Les produits obtenus par la lipophilisation du 4-vinylguaïacol pourraient être appliqués dans la chimie fine (tensioactifs...).

En ce qui concerne la réaction avec le canolol, une étude approfondie de sa réactivité face aux péracides semble être pertinente.

Dans un deuxième temps, l'activité antioxydante du 4-vinylguaïacol et des hydroxy-esters obtenus a été évaluée en milieu émulsionné par la méthode CAT (*Conjugated Autoxidizable Triene Assay*) et exprimée en équivalents trolox (ET). Concernant les

isomères à hydroxyle secondaire, seul l'ester butylique (valeur CAT : $0,55 \pm 0,01$ ET) s'est montré plus efficace que le 4-vinylguaïacol (valeur CAT : $0,40 \pm 0,03$ ET). En revanche, l'activité antioxydante des isomères à hydroxyle primaire s'est avérée supérieure à celle du 4-vinylguaïacol pour les esters comportant 2 à 8 carbones dans leur chaîne alkyle, avec un maximum pour l'ester butylique (valeur CAT : $0,80 \pm 0,04$ ET). Ces résultats ont confirmé l'évolution non linéaire de l'activité antioxydante en fonction de la longueur de la chaîne alkyle de l'ester avec passage par un optimum, dénommée « effet *cut-off* » par d'autres auteurs, et des hypothèses ont été avancées quant au déterminisme de ce phénomène en milieu émulsionné.

Bien que l'activité antioxydante de certains hydroxyesters phénoliques se soit avérée supérieure à celle du 4-vinylguaïacol, elle reste néanmoins relativement faible comparée à celle de certains acides hydroxycinnamiques ou leurs esters : acide chlorogénique, valeur CAT : $2,05 \pm 0,03$ ET ; Chlorogénate de dodécyle, valeur CAT : $2,97 \pm 0,13$ ET ; acide rosmarinique, valeur CAT : $5,21 \pm 0,25$ ET ; **rosmarinate d'octyle, valeur CAT : $15,31 \pm 1,39$ ET**. Parmi les différentes voies d'amélioration envisageables, l'estérification des esters phénoliques à hydroxyle primaire avec des acides hydroxycinnamiques nous semble intéressante. Comme illustré ci-dessous, l'estérification par l'acide caféique permettrait d'accéder à des analogues de rosmarinates d'alkyle dont nous avons mentionné précédemment la forte activité antioxydante.



Une autre possibilité intéressante serait l'étude de la capacité antimicrobienne des hydroxyesters de 4-vinylguaïacol synthétisés dans ce travail.

Enfin, dans la dernière partie de la thèse, nous avons étudié la possibilité de produire des dimères phénoliques ayant une structure chimique proche de celle de l'éther diglycidyle de bisphénol-A (DGEBA). Dans cette optique, la synthèse de dimères diglycidylés du canolol, du 4-vinylguaiacol et de l'eugénol a été envisagée selon deux voies de synthèse. La première a consisté en la réaction des trois composés phénoliques avec l'épichlorohydrine pour conduire à leurs dérivés glycidylés puis la dimérisation de ces dérivés, seuls ou deux par deux, par réaction de métathèse croisée. Par cette voie, divers dimères phénoliques (homodimères et hétérodimères) ont été obtenus avec de bons rendements et une haute diastéréosélectivité. En outre, les proportions et structures des dimères obtenus ont permis de mettre en évidence des différences de comportement entre les composés phénoliques, notamment la réactivité supérieure du canolol par rapport au 4-vinylguaiacol (attribuée à son groupe méthoxy supplémentaire) et l'isomérisation de la liaison allylique de l'eugénol par le catalyseur au ruthénium.

Concernant la deuxième voie de synthèse, la dimérisation de l'eugénol a été réalisée dans des conditions douces par éthérification à l'aide du 1,5-dibromopentane, suivie de l'époxydation chimio-enzymatique des doubles liaisons allyliques. Le dimère époxydé de l'eugénol a été obtenu avec un rendement global de 78%.

Si, au travers de ces deux voies de synthèse, nous avons démontré la possibilité d'accéder à de nouveaux substituts potentiels de DGEBA à partir de composés phénoliques naturels renouvelables, deux points essentiels restent néanmoins à traiter pour en démontrer l'intérêt : d'une part, l'absence de toxicité de ces molécules et, d'autre part, la faisabilité de leur mise en œuvre dans les résines époxy.

Concernant le premier point, une étude portant sur le caractère perturbateur endocrinien des molécules obtenues est en cours de réalisation en partenariat avec le Pr Eric Dubreucq (Montpellier SupAgro, UMR IATE) et le Dr Hélène Fulcrand (DR INRA, UMR SPO). Grâce à des outils de modélisation moléculaire, cette étude devrait nous renseigner sur l'affinité des dimères diépoxydés pour les récepteurs α , et donc sur leur capacité à perturber les voies de signalisation hormonales. En fonction des résultats, cette étude pourra être complétée par des tests biologiques.

En parallèle, la synthèse à l'échelle de la dizaine de grammes d'une sélection de dimères devrait nous permettre de produire des résines époxy dont les propriétés thermomécaniques pourront être évaluées et comparées aux matériaux actuellement sur le marché. En cas de résultats positifs, ces études complémentaires constitueront un appui déterminant aux demandes de brevets déposées.

Il va de soi que la production de canolol et de 4-vinylguaïacol à grande échelle demeure un prérequis indispensable au développement des applications citées précédemment. Si l'obtention directe de canolol par voie thermique à partir des tourteaux de colza semble difficile (compte tenu des faibles rendements observés durant cette étude), sa production à partir d'extraits phénoliques concentrés de tourteaux non traités thermiquement paraît en revanche plus réaliste au regard des résultats prometteurs obtenus récemment par divers auteurs. La production de vinylphénols par des microorganismes à partir de matières premières riches en acides hydroxycinnamiques (ou leurs esters) constitue une autre voie qu'il serait intéressant d'explorer. Dans ce sens, nous venons d'initier un rapprochement avec l'équipe du Dr. Anne Lomascolo (UMR 1163 Biodiversité et Biotechnologie Fongique « BBF » - INRA – UNIVERSITE AIX-MARSEILLE) et un projet de collaboration devrait voir le jour prochainement.

Références Bibliographiques

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdulmalek, E., Arumugam, M., Mizan, H. N., Abdul Rahman, M. B., Basri, M., & Salleh, A. B. (2014), Chemoenzymatic epoxidation of alkenes and reusability study of the phenylacetic acid. *TheScientificWorldJournal*, **2014**, pp. 756418-756418.
- Acherar, S., Audran, G., Vanthuyne, N., & Monti, H. (2003), Use of lipase-catalyzed kinetic resolution for the enantioselective approach toward sesquiterpenes containing quaternary centers: the cuparane family. *Tetrahedron-Asymmetry*, **14**, 16, pp. 2413-2418.
- Aldabalde V. (2011), Organocatalyzed Decarboxylation of Naturally Occurring Cinnamic Acids: Potential Role in Flavoring Chemicals Production. *Open Journal of Physical Chemistry*, **1**, pp. 85-93.
- Amarowicz R., Shahidi F. (1994), Chromatographic-separation of glucopyranosyl sinapate from canola-meal. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **71**, 5, pp. 551-552.
- Amigues, P., Chauvin, Y., Commereuc, D., Hong, C. T., Lai, C. C., & Liu, Y. H. (1991), METHATHESIS OF ETHYLENE BUTENE MIXTURES TO PROPYLENE WITH RHENIUM ON ALUMINA CATALYSTS. *Journal of Molecular Catalysis*, **65**, 1-2, pp. 39-50.
- Annual Publication CETIOM P. (2012). Le colza, de la plante à ses produits. Grignonp.
- Aouf, C., Durand, E., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Dubreucq, E., Fulcrand, H., & Villeneuve, P. (2014), The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. *Green Chemistry*, **16**, 4, pp. 1740-1754.

- Aouf, C., Le Guerneve, C., Caillol, S., & Fulcrand, H. ionship between the phenolic structure and the reaction mechanism. *Tetrahedron Letters*, pp.
- Aouf, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., Dubreucq, E., & Fulcrand, H. (2012), Chemo-enzymatic functionalization of gallic and vanillic acids: synthesis of bio-based epoxy resins prepolymers. *Green Chemistry*, **14**, 8, pp. 2328-2336.
- Artz, W., Swanson, B., Sendzicki, B., Rasyid, A., & Birch, R. (1986). Protein-procyanidin interaction and nutritional quality of dry beans. *ACS Symposium series-American Chemical Society (USA)*, pp.
- Astruc D. (2005), The metathesis reactions: from a historical perspective to recent developments. *New Journal of Chemistry*, **29**, 1, pp. 42-56.
- Audran X. (2013), French law baning Bisphenol A in food containers Enacted. *Global Agricultural Information Network*, pp.
- Azadmard-Damirchi S., Habibi-Nodeh F., Hesari J., Nemati M., Achachlouei B. F. (2010), Effect of pretreatment with microwaves on oxidative stability and nutraceuticals content of oil from rapeseed. *Food Chemistry*, **121**, 4, pp. 1211-1215.
- Bae, J., Kim, S., Kannan, K., & Louis, G. M. B. (2015), Couples' urinary bisphenol A and phthalate metabolite concentrations and the secondary sex ratio. *Environmental Research*, **137**, pp. 450-457.
- Bahri-Laleh N., Credendino R., Cavallo L. (2011), The intriguing modeling of cis-trans selectivity in ruthenium-catalyzed olefin metathesis. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **7**, pp. 40-45.
- Balgavy P., Devinsky F. (1996), Cut-off effects in biological activities of surfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*, **66**, pp. 23-63.

- Baqueiro-Pena, I., Rodriguez-Serrano, G., Gonzalez-Zamora, E., Augur, C., Loera, O., & Saucedo-Castaneda, G. (2010), Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiaicol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, **101**, 12, pp. 4721-4724.
- Bayrasy, C., Chabi, B., Laguerre, M., Lecomte, J., Jublanc, E., Villeneuve, P., Wrutniak-Cabello, C., & Cabello, G. (2013), Boosting Antioxidants by Lipophilization: A Strategy to Increase Cell Uptake and Target Mitochondria. *Pharmaceutical Research*, **30**, 8, pp. 1979-1989.
- Bernhardt P., Halt K., Kazlauskas R. J. (2005), Molecular basis of perhydrolase activity in serine hydrolases. *Angewandte Chemie-International Edition*, **44**, 18, pp. 2742-2746.
- Bernini, R., Mincione, E., Barontini, M., Provenzano, G., & Setti, L. (2007), Obtaining 4-vinylphenols by decarboxylation of natural 4-hydroxycinnamic acids under microwave irradiation. *Tetrahedron*, **63**, 39, pp. 9663-9667.
- Bjorkling, F., Frykman, H., Godtfredsen, S. E., & Kirk, O. (1992), Lipase catalyzed synthesis of peroxy-carboxylic acids and lipase mediated oxidations. *Tetrahedron*, **48**, 22, pp. 4587-4592.
- Bjorkling F., Godtfredsen S. E., Kirk O. (1990), Lipase-mediated formation of peroxy-carboxylic acids used in catalytic epoxidation of alkenes. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 19, pp. 1301-1303.
- Bodamyali, T., Stevens, C. R., Blake, D. R., & Winyard, P. G. (2000), Reactive oxygen/nitrogen species and acute inflammation: A physiological process. *Free Radicals and Inflammation*, pp. 11-16.
- Bogdan Allemann I., Baumann L. (2008), Antioxidants used in skin care formulations. *Skin therapy letter*, **13**, 7, pp. 5-9.

- Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R., & Krishna, S. H. (2002), Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, **20**, 10, pp. 433-437.
- Borrell B. (2010), Toxicology: The big test for bisphenol A. *Nature*, **464**, 7292, pp. 1122-1124.
- Cabrera, Z., Gutarra, M. L. E., Guisan, J. M., & Palomo, J. M. (2010), Highly enantioselective biocatalysts by coating immobilized lipases with polyethyleneimine. *Catalysis Communications*, **11**, 11, pp. 964-967.
- Cai R., Arntfield S. D. (2001), A rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of sinapine and sinapic acid in canola seed and meal. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78**, 9, pp. 903-910.
- Callemien D., Dasnoy S., Collin S. (2006), Identification of a stale-beer-like odorant in extracts of naturally aged beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 4, pp. 1409-1413.
- Cao, D. H., Jiang, J., Tsukamoto, T., Liu, R., Ma, L., Jia, Z., Kong, F., Oshima, M., & Cao, X. (2015), Canolol Inhibits Gastric Tumors Initiation and Progression through COX-2/PGE2 Pathway in K19-C2mE Transgenic Mice. *Plos One*, **10**, 3, pp.
- Cao, X., Tsukamoto, T., Seki, T., Tanaka, H., Morimura, S., Cao, L., Mizoshita, T., Ban, H., Toyoda, T., Maeda, H., & Tatematsu, M. (2008), 4-Vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) suppresses oxidative stress and gastric carcinogenesis in Helicobacter pylori-infected carcinogen-treated Mongolian gerbils. *International Journal of Cancer*, **122**, 7, pp. 1445-1454.

- Cao, X. Y., Jiang, J., Cao, D. H., Tsukamoto, T., & Maeda, H. (2012), Anti-cancer effects of canolol against human gastric carcinoma cells SGC-7901/R. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **27**, pp. 334-335.
- Castro, B., Sanchez, P., Torres, J. M., & Ortega, E. (2013), Effects of Adult Exposure to Bisphenol A on Genes Involved in the Physiopathology of Rat Prefrontal Cortex. *Plos One*, **8**, 9, pp.
- Cavero, S., Garcia-Risco, M. R., Marin, F. R., Jaime, L., Santoyo, S., Senorans, F. J., Reglero, G., & Ibanez, E. (2006), Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano - Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays. *Journal of Supercritical Fluids*, **38**, 1, pp. 62-69.
- Cerretani L., Bendini A., Rodriguez-Estrada M. T., Vittadini E., Chiavaro E. (2009), Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*, **115**, 4, pp. 1381-1388.
- CETIOM (page mise à jour le Composition of oilseeds and meals http://www.cetiom.fr/uploads/tx_cetiomlists/qualite_tourteaux_colza_2013.pdf.
- CETIOM (page mise à jour le Composition of oilseeds and meals. http://www.cetiom.fr/uploads/tx_cetiomlists/qualite_graines_colza_recolte_2014.pdf.
- CETIOM I. A. (2011). Le tourteau de colza : sûr, économique et facile à utiliser. In Spécial élevage (Inovia T., ed.), pp. 18-23. Terres Inovia.
- Chang Z., Mei Y., Qi Z., Chang-Sheng L., Feng-Hong H. (2014), Changes in the content of canolol and total phenolics, oxidative stability of rapeseed oil during accelerated storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **116**, 12, pp. 1675-1684.

- Chen, X., Gu, W., Jing, X., & Pan, X. (2002), A new approach for synthesis of erythro 8-o-40 neolignans. *SYNTHETIC COMMUNICATIONS*, **32**, 4, pp. 557–564.
- Chen, Z. J., Yang, X. L., Liu, H., Wei, W., Zhang, K. S., Huang, H. B., Giesy, J. P., Liu, H. L., Du, J., & Wang, H. S. (2015), Bisphenol A modulates colorectal cancer protein profile and promotes the metastasis via induction of epithelial to mesenchymal transitions. *Archives of Toxicology*, **89**, 8, pp. 1371-1381.
- Chipurura B., Muchuweti M., Manditseraa F. (2010), Effects of thermal treatment on the phenolic content and antioxidant activity of some vegetables. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, **2**, 3, pp. 93-100.
- Corey E. J., Venkates A. (1972), Protection of hydroxyl groups as *tert*-butyldimethylsilyl derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, **94**, 17, pp. 6190-&.
- Courchay F. C., Sworen J. C., Wagener K. B. (2003), Metathesis activity and stability of new generation ruthenium polymerization catalysts. *Macromolecules*, **36**, 22, pp. 8231-8239.
- Dai J., Mumper R. J. (2010), Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, **15**, 10, pp. 7313-7352.
- de Espinosa L. M., Winkler M., Meier M. A. R. (2013), Acyclic Diene Metathesis Polymerization and Heck Polymer-Polymer Conjugation for the Synthesis of Star-shaped Block Copolymers. *Macromolecular Rapid Communications*, **34**, 17, pp. 1381-1386.
- de Lucas, A., de la Ossa, E. M., Rincon, J., Blanco, M. A., & Gracia, I. (2002), Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves. *Journal of Supercritical Fluids*, **22**, 3, pp. 221-228.

- Dewick P. M. (2001). Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, West Sussex, United Kingdom.
- Dias E. L., Nguyen S. T., Grubbs R. H. (1997), Well-defined ruthenium olefin metathesis catalysts: Mechanism and activity. *Journal of the American Chemical Society*, **119**, 17, pp. 3887-3897.
- Edreva A. (2005), The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agriculture Ecosystems & Environment*, **106**, 2-3, pp. 135-146.
- EFSA (2015). Comprendre l'évaluation des risques du BPA réalisée par l'EFSA. ((EFSA) E. F. S. A., ed.), pp. 1-2. Autorité européenne de sécurité des aliments, 2015, Parme.
- Fache, M., Auvergne, R., Boutevin, B., & Caillol, S. (2015a), New vanillin-derived diepoxy monomers for the synthesis of biobased thermosets. *European Polymer Journal*, **67**, June 2015, pp. 527–538.
- Fache, M., Viola, A., Auvergne, R., Boutevin, B., & Caillol, S. (2015b), Biobased epoxy thermosets from vanillin-derived oligomers. *European Polymer Journal*, **68**, pp. 526-535.
- Fang, J. J., Reichelt, M., Hidalgo, W., Agnolet, S., & Schneider, B. (2012), Tissue-Specific Distribution of Secondary Metabolites in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plos One*, **7**, 10, pp.
- FEDIOL *The EU Vegetable Oil and Proteinmeal Industry*, pp. <http://www.fediol.eu/>.
- Figueroa-Espinoza M. C., Villeneuve P. (2005), Phenolic acids enzymatic lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 8, pp. 2779-2787.

- Fine, F. Lucas, J., Chardigny, J., Redlingshöfer, B., Renard, M. (2015), Food losses and waste in the French oilcrops sector. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, **22**, 3 A302, pp. 1-14.
- Forget-Champagne, D., Mondon, M., Fonteneau, N., & Gesson, J. P. (2001), Selective cross-metathesis of 2-allylphenols with styrenes. *Tetrahedron Letters*, **42**, 41, pp. 7229-7231.
- Frederico D., Brocksom U., Brocksom T. J. (2005), The olefin metathesis reaction: reorganization and ciclization of organic compounds. *Quimica Nova*, **28**, 4, pp. 1678-7064.
- Galano A., Francisco-Marquez M., Alvarez-Idaboy J. R. (2011), Canolol: A Promising Chemical Agent against Oxidative Stress. *Journal of Physical Chemistry B*, **115**, 26, pp. 8590-8596.
- Gelmez N., Kincal N. S., Yener M. E. (2009), Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, **48**, 3, pp. 217-224.
- Giraldo, L. J. L., Laguerre, M., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Barouh, N., Barea, B., & Villeneuve, P. (2007), Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium. *Enzyme and Microbial Technology*, **41**, 6-7, pp. 721-726.
- Gladiali S., Mestroni G. (1998). Transition Metals for Organic Synthesis. Beller, M., Bolm, C., Wiley-VCH éd., Weinheim.
- Grajeda-Iglesias, C., Salas, E., Barouh, N., Baréa, B., Panya, A., & Figueroa-Espinoza, M. C. (2015), Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods. *Food Chemistry*, **In Press**, pp.

- Grubbs R. H., Burk P. L., Carr D. D. (1975), Consideration of mechanism of olefin metathesis reaction. *Journal of the American Chemical Society*, **97**, 11, pp. 3265-3267.
- Guillen M. D., Ibargoitia M. L. (1998), New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4, pp. 1276-1285.
- Guyot, B., Bosquette, B., Pina, M., & Graille, J. (1997), Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnology Letters*, **19**, 6, pp. 529-532.
- Han, Z.-P., Liu, R.-L., Cui, H.-Y., & Zhang, Z.-Q. (2013), MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION AND LC/MS ANALYSIS OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS IN SWEET APRICOT (*PRUNUS ARMENIACA* L.) KERNEL SKINS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **36**, 15, pp. 2182-2195.
- Harbaum-Piayda, B., Oehlke, K., Sönnichsen, F. D., Zacchi, P., Eggers, R., & Schwarz, K. (2010), New polyphenolic compounds in commercial deodistillate and rapeseed oils. *Food Chemistry*, **123**, 3, pp. 607-615.
- Harman D. (1956), Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology*, **11**, 3, pp. 298-300.
- Harvey, B. G., Guenther, A. J., Lai, W. W., Meylemans, H. A., Davis, M. C., Cambrea, L. R., Reams, J. T., & Lamison, K. R. (2015), Effects of o-Methoxy Groups on the Properties and Thermal Stability of Renewable High-Temperature Cyanate Ester Resins. *Macromolecules*, **48**, 10, pp. 3173-3179.
- Hengstler, J. G., Foth, H., Gebel, T., Kramer, P. J., Lilienblum, W., Schweinfurth, H., Voelkel, W., Wollin, K. M., & Gundert-Remy, U. (2011), Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Critical Reviews in Toxicology*, **41**, 4, pp. 263-291.

- Hyun-Hee L., Eun-Ok K., Mi-Jae S., Sang-Won C. (2011), Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **40**, 10, pp. 1361-1370.
- Ikken, Y., Morales, P., Martinez, A., Marin, M. L., Haza, A. I., & Cambero, M. I. (1999), Antimutagenic effect of fruit and vegetable ethanolic extracts against N-nitrosamines evaluated by the ames test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 8, pp. 3257-3264.
- Imre B., Pukánszky B. (2015), From natural resources to functional polymeric biomaterials. *European Polymer Journal*, **68**, 2015, pp. 481–487.
- Itabaiana I., Jr., de Mariz e Miranda L. S., Mendonca Alves de Souza R. O. (2013), Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **85-86**, pp. 1-9.
- Iwanowska, A., Tykarska, T., Kuras, M., & Zobel, A. M. (1994), Localization of phenolic-compounds in the covering tissues of the embryo of *Brassica-napus* (L) during different stages of embryogenesis and seed maturation. *Annals of Botany*, **74**, 4, pp. 313-320.
- Jain P., Choudhary V., Varma I. K. (2003), Effect of structure on thermal behaviour of epoxy resins. *European Polymer Journal*, **39**, 1, pp. 181-187.
- Jiang, J., Cao, D. H., Tsukamoto, T., Wang, G. Q., Jia, Z. F., Suo, J., & Cao, X. Y. (2013), Anticancer effects of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (canolol) against SGC-7901 human gastric carcinoma cells. *Oncology Letters*, **5**, 5, pp. 1562-1566.
- Joya Jorge, A., Toledo Heliodoro, D. L. G., Cruz Alejandro, Z., Cerda Ruth, B., & Cristobal Noe, A. (2013), The optimization of phenolic compounds extraction

- from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **3**, 6, pp. 436-442.
- Kahveci D., Laguerre M., Villeneuve P. (2015). Phenolipids as New Antioxidants: Production, Activity and Potential Applications. *In: Polar Lipids - Biology, Chemistry and Technology. Ahmad M. U. ,Xu X. eds.*, AOCS, Urbana, IL, vol. 1, pp. 185-214.
- Kaufman T. S. (2015), The Multiple Faces of Eugenol. A Versatile Starting Material and Building Block for Organic and Bio-Organic Synthesis and a Convenient Precursor Toward Bio-Based Fine Chemicals. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **26**, 6, pp. 1055-1085.
- Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata, M., & Oikawa, S. (2002), The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 9, pp. 822-832.
- Khattab, R., Eskin, M., Aliani, M., & Thiyam, U. (2010), Determination of Sinapic Acid Derivatives in Canola Extracts Using High-Performance Liquid Chromatography. *J Am Oil Chem Soc*, **87**, pp. 147–155.
- Khattab R. Y., Eskin M. N. A., Thiyam-Hollander U. (2014), Production of Canolol from Canola Meal Phenolics via Hydrolysis and Microwave-Induced Decarboxylation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **91**, 1, pp. 89-97.
- Koski, A., Pekkarinen, S., Hopia, A., Wahala, K., & Heinonen, M. (2003), Processing of rapeseed oil: effects on sinapic acid derivative content and oxidative stability. *European Food Research and Technology*, **217**, 2, pp. 110-114.

- Kozłowska, H., Naczek, M., Shahidi, F., & Zadernowski, R. (1990). Phenolic Acids and Tannins in Rapeseed and Canola. *In: Canola and Rapeseed. Shahidi F. ed.*, Springer US, pp. 193-210.
- Kozłowska H., Zadernowski R., Sosulski F. W. (1983), Phenolic-acids in oilseed flours. *Nahrung-Food*, **27**, 5, pp. 449-453.
- Kraljic, K., Skevin, D., Barisic, L., Kovacevic, M., Obranic, M., & Jurcevic, I. (2015), Changes in 4-vinylsyringol and other phenolics during rapeseed oil refining. *Food Chemistry*, **187**, pp. 236-242.
- Kreye O., Toth T., Meier M. A. R. (2011), Copolymers derived from rapeseed derivatives via ADMET and thiol-ene addition. *European Polymer Journal*, **47**, 9, pp. 1804-1816.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L., & Feldman, D. (1993), Bisphenol-A - An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, **132**, 6, pp. 2279-2286.
- Kuwahara, H., Kanazawa, A., Wakamatu, D., Morimura, S., Kida, K., Akaike, T., & Maeda, H. (2004), Antioxidative and antimutagenic activities of 4-vinyl-2,6-dimethoxyphenol (Canolol) isolated from canola oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 14, pp. 4380-4387.
- Laguerre M. (2008). Bases moléculaires de la capacité antioxydante de composés phénoliques : étude en milieux homogène, émulsionné et cellulaire, Université Montpellier II, Montpellier, 241p.
- Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Chabi, B., Decker, E. A., Wrutniak-Cabello, C., Cabello, G., & Villeneuve, P. (2013a), How to boost antioxidants by lipophilization? *Biochimie*, **95**, 1, pp. 20-26.

- Laguerre, M., Bayrasy, C., Panya, A., Weiss, J., McClements, D. J., Lecomte, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2014), What Makes Good Antioxidants in Lipid-Based Systems? The Next Theories Beyond the Polar Paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **55**, 2, pp. 183-201.
- Laguerre, M., Giraldo, L. J. L., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Barea, B., Weiss, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2009a), Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 23, pp. 11335-11342.
- Laguerre, M., Giraldo, L. J. L., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Barea, B., Weiss, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2010), Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of "Phenolipids" in Emulsion: A Parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 5, pp. 2869-2876.
- Laguerre, M., Giraldo, L. J. L., Piombo, G., Figueroa-Espinoza, M. C., Pina, M., Benaissa, M., Combe, A., Castera, A. R., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2009b), Characterization of Olive-Leaf Phenolics by ESI-MS and Evaluation of their Antioxidant Capacities by the CAT Assay. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **86**, 12, pp. 1215-1225.
- Laguerre, M., Lopez-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Barea, B., Cambon, E., Tchobo, P. F., Barouh, N., & Villeneuve, P. (2008), Conjugated autoxidizable triene (CAT) assay: A novel spectrophotometric method for determination of antioxidant capacity using triacylglycerol as ultraviolet probe. *Analytical Biochemistry*, **380**, 2, pp. 282-290.
- Laguerre, M., Villeneuve, P., Christelle, B., Lecomte, J., Chabi, B., Jublanc, E., Wrutniak-Cabello, C., & Cabello, G. (2013b), From phenolic acids to phenolipids: A strategy to improve antioxidant activity in emulsions and cells. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **246**, pp.

- Lee, J. H., Panya, A., Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., & Decker, E. A. (2013), Comparison of Antioxidant Capacities of Rosmarinate Alkyl Esters in Riboflavin Photosensitized Oil-in-Water Emulsions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **90**, 2, pp. 225-232.
- Lefort, D., Fossey, J., Gruselle, M., Nedelec, J. Y., & Sorba, J. (1985), REACTIVITY AND SELECTIVITY OF HOMOLYTIC SUBSTITUTION-REACTIONS ON THE PEROXYACID GROUP. *Tetrahedron*, **41**, 19, pp. 4237-4252.
- Lehman, S. E., Schwendeman, J. E., O'Donnell, P. M., & Wagener, K. B. (2003), Olefin isomerization promoted by olefin metathesis catalysts. *Inorganica Chimica Acta*, **345**, pp. 190-198.
- Lichtenberg D., Pinchuk I. (2015), Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **461**, 3, pp. 441-444.
- LIU, Q., WUA, L., PU, H., LI, C., & HU, Q. (2012), Profile and distribution of soluble and insoluble phenolics in Chinese rapeseed (*Brassica napus*). *Food Chemistry*, **135**, pp. 616–622.
- Lofstedt R. (2013), Communicating Food Risks in an Era of Growing Public Distrust: Three Case Studies. *Risk Analysis*, **33**, 2, pp. 192-202.
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Sigoillot, J.-C., & Fine, F. (2012), Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **95**, 5, pp. 1105-1114.
- Losada Barreiro, S., Bravo-Diaz, C., Paiva-Martins, F., & Romsted, L. S. (2013), Maxima in Antioxidant Distributions and Efficiencies with Increasing Hydrophobicity of Gallic Acid and Its Alkyl Esters. The Pseudophase Model Interpretation of the "Cutoff Effect". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **61**, 26, pp. 6533-6543.

- Mabinya L. V., Mafunga T., Brand J. M. (2010), Bioconversion of ferulic acid and 4-vinylguaiacol by a white-rot fungus isolated from decaying wood. *African Journal of Biotechnology*, **9**, 13, pp. 1955-1958.
- Maeda, H., Cao, X. Y., Tsukamoto, T., Seki, T., Kuwahara, H., & Tatematsu, M. (2006), Inhibition of bacterial mutagenesis and carcinogenesis in *Helicobacter pylori* infected gerbil model by using a phenolic compound from crude rape seed oil, canolol. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, **14**, 4, pp. A17-A17.
- Mancilla, G., Femenia-Rios, M., Grande, M., Hernandez-Galan, R., Macias-Sanchez, A. J., & Collado, I. G. (2010), Enantioselective, chemoenzymatic synthesis, and absolute configuration of the antioxidant (-)-gloeosporiol. *Tetrahedron*, **66**, 40, pp. 8068-8075.
- Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L., & Bravo, L. (2005), Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress - Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **827**, 1, pp. 76-82.
- Matthaus B. (2002), Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 12, pp. 3444-3452.
- Medina, I., Lois, S., Alcantara, D., Lucas, R., & Morales, J. C. (2009), Effect of Lipophilization of Hydroxytyrosol on Its Antioxidant Activity in Fish Oils and Fish Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 20, pp. 9773-9779.
- Meneses, N. G. T., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013), Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from

- brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, **108**, pp. 152-158.
- Mialon L., Pemba A. G., Miller S. A. (2010), Biorenewable polyethylene terephthalate mimics derived from lignin and acetic acid. *Green Chemistry*, **12**, 10, pp. 1704-1706.
- Mielke T. (2013). The Global Market for Oilseeds and Vegetable Oils. *Oils & Fats Seminar of Olenex*, Hamburg, 03/09/2015, pp. 1-29.1).
- Morrill T. C., D'Souza C. A. (2003), Efficient hydride-assisted isomerization of alkenes via rhodium catalysis. *Organometallics*, **22**, 8, pp. 1626-1629.
- Naczki, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., & Shahidi, F. (1998), Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chemistry*, **62**, 4, pp. 489-502.
- Naczki M., Shahidi F. (2004), Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, **1054**, 1-2, pp. 95-111.
- Nelson A. M., Long T. E. (2012), A perspective on emerging polymer technologies for bisphenol-A replacement. *Polymer International*, **61**, 10, pp. 1485-1491.
- Niu, Y., Jiang, M., Wan, C., Yang, M., & Hu, S. (2013), Effect of Microwave Treatment on Sinapic Acid Derivatives in Rapeseed and Rapeseed Meal. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **90**, 2, pp. 307-313.
- Nouailhas, H., Aouf, C., Le Guerneve, C., Caillol, S., Boutevin, B., & Fulcrand, H. (2011), Synthesis and Properties of Biobased Epoxy Resins. Part 1. Glycidylation of Flavonoids by Epichlorohydrin. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*, **49**, 10, pp. 2261-2270.

- Nouailhas, H., Burguiere, C., Caillol, S., Boutevin, B., Fulcrand, H., & Rapior, S. (2010). Composés phénoliques naturels et leur mode d'activation pour la formulation de résines thermodurcissables. In Institut National de la Propriété Industrielle (Durable C. E. d. C. N. p. u. D., ed.), Vol. 2946049, pp. 1-25, France.
- Nowak, H., Kujawa, K., Zadernowski, R., Rocznik, B., & Kozłowska, H. (1992), ANTIOXIDATIVE AND BACTERICIDAL PROPERTIES OF PHENOLIC-COMPOUNDS IN RAPESEEDS. *Fett Wissenschaft Technologie-Fat Science Technology*, **94**, 4, pp. 149-152.
- Odian G. ed. (2004). Principles of Polymerization. John Wiley, Hoboken, New Jersey.
- Oliveira L. d. L. d., Carvalho M. V. d., Melo L. (2014), Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Revista Ceres*, **61**, pp. 764-779.
- Olmedo R. H., Asensio C. M., Grosso N. R. (2015), Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. *Industrial Crops and Products*, **69**, pp. 21-28.
- Orellana-Coca, C., Adlercreutz, D., Andersson, M. M., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2005a), Analysis of fatty acid epoxidation by high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *Chemistry and Physics of Lipids*, **135**, 2, pp. 189-199.
- Orellana-Coca, C., Camacho, S., Adlercreutz, D., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2005b), Chemo-enzymatic epoxidation of linoleic acid: Parameters influencing the reaction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **107**, 12, pp. 864-870.
- Paál, T. A., Forró, E., Liljeblad, A., Kanerva, L. T., & Fülöp, F. (2007), Lipase-catalyzed kinetic and dynamic kinetic resolution of 1,2,3,4-

tetrahydroisoquinoline-1-carboxylic acid. *Tetrahedron: Asymmetry*, **18**, 2007, pp. 1428–1433.

Palmans A. R. A., Heise A. (2010). Enzymatic polymerisation. In: *Spring-Verlag ed.*, Heidelberg, Berlin, pp.

Panya, A., Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2012), An Investigation of the Versatile Antioxidant Mechanisms of Action of Rosmarinate Alkyl Esters in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 10, pp. 2692-2700.

Pederson, R. L., Fellows, I. M., Ung, T. A., Ishihara, H., & Hajela, S. P. (2002), Applications of olefin cross metathesis to commercial products. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **344**, 6-7, pp. 728-735.

Perignon, M., Lecomte, J., Pina, M., Renault, A., Simonneau-Deve, C., & Villeneuve, P. (2013), Activity of immobilized *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B Lipases in Interesterification Reactions: Effect of the Aqueous Microenvironment. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **90**, 8, pp. 1151-1156.

Planetoscope.com (page mise à jour le Production de bisphénol A, BPA dans le monde <http://www.planetoscope.com/Sante-autre/1014-production-de-bisphenol-a-bpa-dans-le-monde.html>).

PROLEA (page mise à jour le PROLEA : La filière française des Huiles et Protéines Végétales. <http://www.prolea.com/>).

PROLEA (2012-2013). Statistiques des oléagineux et protéagineux : France, Europe, Monde. In De la production à la consommation (PROLEA, ed.), Vol. 2012-2013. Proléa-Dokumentation, Paris.

- Pudel, F., Habicht, V., Piofczyk, T., Matthäus, B., Quirin, K.-W., & Cawelius, A. (2014), Fluidized bed treatment of rapeseed meal and cake as possibility for the production of canolol. *OCL*, **21**, 1, pp. D103.
- Raja MRC S. V., Selvaraj S, Mahapatra SK (2015), Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review. *Pharmaceutica Analytica Acta*, **6**, 5, pp. 1-6.
- Ritter S. K., Bryson R. (2011), CHEMICAL YEAR IN REVIEW 2011. *Chemical & Engineering News*, **89**, 51, pp. 13-16.
- Rosazza, J. P. N., Huang, Z., Dostal, L., Volm, T., & Rousseau, B. (1995), Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: An abundant aromatic natural product. *Journal of Industrial Microbiology*, **15**, 6, pp. 457-471.
- Rubin B. S., Soto A. M. (2009), Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **304**, 1-2, pp. 55-62.
- Runarsson, O. V., Malainer, C., Holappa, J., Sigurdsson, S. T., & Masson, M. (2008), tert-Butyldimethylsilyl O-protected chitosan and chitooligosaccharides: useful precursors for N-modifications in common organic solvents. *Carbohydrate Research*, **343**, 15, pp. 2576-2582.
- Sabally, K., Karboune, S., St-Louis, R., & Kermasha, S. (2006), Lipase-catalyzed transesterification of dihydrocaffeic acid with flaxseed oil for the synthesis of phenolic lipids. *Journal of Biotechnology*, **127**, 1, pp. 167-176.
- Sachidanandam K., Fagan S. C., Ergul A. (2005), Oxidative stress and cardiovascular disease: Antioxidants and unresolved issues. *Cardiovascular Drug Reviews*, **23**, 2, pp. 115-132.
- Sanda Vladimir-Knežević, Biljana Blažeković, Štefan, M. B., & Babac, M. (2012). Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health, Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition

and Health. Venketeshwer Rao éd., InTech, 288 p. (Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health).

Sarma, K., Bhati, N., Borthakur, N., & Goswami, A. (2007), A novel method for the synthesis of chiral epoxides from styrene derivatives using chiral acids in presence of *Pseudomonas* lipase G6 PSL G6 and hydrogen peroxide. *Tetrahedron*, **63**, 36, pp. 8735-8741.

Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K., & Maeda, H. (1999), Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: Implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 2, pp. 397-402.

Schmidt B. (2004), Catalysis at the interface of ruthenium carbene and ruthenium hydride chemistry: Organometallic aspects and applications to organic synthesis. *European Journal of Organic Chemistry*, 9, pp. 1865-1880.

Schoenstein L., Forro E., Fueleop F. (2013), Continuous-flow enzymatic resolution strategy for the acylation of amino alcohols with a remote stereogenic centre: synthesis of calycotomine enantiomers. *Tetrahedron-Asymmetry*, **24**, 4, pp. 202-206.

Schrock R. R. (1990), LIVING RING-OPENING METATHESIS POLYMERIZATION CATALYZED BY WELL-CHARACTERIZED TRANSITION-METAL ALKYLIDENE COMPLEXES. *Accounts of Chemical Research*, **23**, 5, pp. 158-165.

Schwab P., Grubbs R. H., Ziller J. W. (1996), Synthesis and Applications of $\text{RuCl}_2(\text{CHR}')(\text{PR}_3)_2$: The Influence of the Alkylidene Moiety on Metathesis Activity. *Journal of the American Chemical Society*, **118**, 1, pp. 100-110.

Shahidi F. (2000), Antioxidant factors in plant foods and selected oilseeds. *Biofactors*, **13**, 1-4, pp. 179-185.

- Shahidi F., Ambigaipalan P. (2015), Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects: A review. *Journal of functional foods*, **In press**, pp.
- Shahidi F., Zhong Y. (2010), Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **112**, 9, pp. 930-940.
- Shrestha K., De Meulenaer B. (2014), Effect of Seed Roasting on Canolol, Tocopherol, and Phospholipid Contents, Maillard Type Reactions, and Oxidative Stability of Mustard and Rapeseed Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 24, pp. 5412-5419.
- Shrestha K., Stevens C. V., De Meulenaer B. (2012), Isolation and Identification of a Potent Radical Scavenger (Canolol) from Roasted High Erucic Mustard Seed Oil from Nepal and Its Formation during Roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **60**, 30, pp. 7506-7512.
- Sies H. (1985). Oxidative Stress: Introductory Remarks. Academic Press Inc. (London) Ltd., Londresp. (Oxidative Stress).
- Simpson C. J., Fitzhenry M. J., Stamford N. P. J. (2005), Preparation of vinylphenols from 2- and 4-hydroxybenzaldehydes. *Tetrahedron Letters*, **46**, pp. 6893–6896.
- Sinha A. K., Sharma A., Joshi B. P. (2007), One-pot two-step synthesis of 4-vinylphenols from 4-hydroxy substituted benzaldehydes under microwave irradiation: a new perspective on the classical Knoevenagel-Doebner reaction. *Tetrahedron*, **63**, 4, pp. 960-965.
- Sorensen, A.-D. M., Durand, E., Laguerre, M., Bayrasy, C., Lecomte, J., Villeneuve, P., & Jacobsen, C. (2014), Antioxidant Properties and Efficacies of Synthesized

- Alkyl Caffeates, Ferulates, and Coumarates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 52, pp. 12553-12562.
- Sorensen, A. D. M., Petersen, L. K., de Diego, S., Nielsen, N. S., Lue, B. M., Yang, Z., Xu, X., & Jacobsen, C. (2012), The Antioxidative Effect of Lipophilized Rutin and Dihydrocaffeic Acid in Fish Oil Enriched Milk. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **114**, pp. 434–445.
- Spielmeyer A., Wagner A., Jahreis G. (2009), Influence of thermal treatment of rapeseed on the canolol content. *Food Chemistry*, **112**, 4, pp. 944-948.
- Stamatis H., Sereti V., Kolisis F. N. (1999), Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **76**, 12, pp. 1505-1510.
- Suarez, M., Romero, M.-P., Ramo, T., Macia, A., & Motilva, M.-J. (2009), Methods for Preparing Phenolic Extracts from Olive Cake for Potential Application as Food Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 4, pp. 1463-1472.
- Suriyarak, S., Bayrasy, C., Schmidt, H., Villeneuve, P., & Weiss, J. (2013), Impact of Fatty Acid Chain Length of Rosmarinate Esters on Their Antimicrobial Activity against *Staphylococcus carnosus* LTH1502 and *Escherichia coli* K-12 LTH4263. *Journal of Food Protection*, **76**, 9, pp. 1539-1548.
- Suriyarak, S., Gibis, M., Schmidt, H., Velleneuve, P., & Weiss, J. (2014), Antimicrobial Mechanism and Activity of Dodecyl Rosmarinate against *Staphylococcus carnosus* LTH1502 as Influenced by Addition of Salt and Change in pH. *Journal of Food Protection*, **77**, 3, pp. 444-452.
- Szydlowska-Czerniak A., Amarowic R., Szlyk E. (2014), Antioxidant Capacity of Rapeseed Extracts Obtained by Conventional and Ultrasound-Assisted

Extraction. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **91**, 12, pp. 2011-2019.

Takemoto M., Achiwa K. (2001), Synthesis of styrenes through the biocatalytic decarboxylation of trans-cinnamic acids by plant cell cultures. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **49**, 5, pp. 639-641.

Terpinc, P., Ceh, B., Ulrih, N. P., & Abramovic, H. (2012), Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products*, **39**, pp. 210-217.

Terpinc, P., Polak, T., Segatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrih, N. P., & Abramovic, H. (2011), Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chemistry*, **128**, 1, pp. 62-69.

TERRES-INOVIA (2015). CHIFFRES CLES - Oléagineux et plantes riches en protéines. (Inovia T., ed.), pp. 4-11. Terres Inovia, Paris.

Thiyam-Hollaender, U., Aladedunye, F., Logan, A., Yang, H., & Diehl, B. W. K. (2014), Identification and quantification of canolol and related sinapate precursors in Indian mustard oils and Canadian mustard products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **116**, 12, pp. 1664-1674.

Thiyam U., Stockmann H., Schwarz K. (2006), Antioxidant activity of rapeseed phenolics and their interactions with tocopherols during lipid oxidation. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **83**, 6, pp. 523-528.

Tornvall, U., Orellana-Coca, C., Hatti-Kaul, R., & Adlercreutz, D. (2007), Stability of immobilized *Candida antarctica* lipase B during chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids. *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 3, pp. 447-451.

- Turcu M. C., Kiljunen E., Kanerva L. T. (2007), Transformation of racemic ethyl 3-hydroxybutanoate into the (R)-enantiomer exploiting lipase catalysis and inversion of configuration. *Tetrahedron-Asymmetry*, **18**, 14, pp. 1682-1687.
- Tzagoloff A. (1963), Metabolism of sinapine in mustard plants.1. Degradation of sinapine into sinapic acid and choline. *Plant Physiology*, **38**, 2, pp. 202-&.
- Ueda M. (2004), A study an the characteristics of antiplasticized polycarbonates and their optical disk substrates. *Polymer Engineering and Science*, **44**, 10, pp. 1877-1884.
- Unger E. (1990). Commercial Processing of Canola and Rapeseed: Crushing and Oil Extraction. *In: Canola and Rapeseed. Shahidi F. ed.*, Springer US, pp. 235-249.
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008), Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, **107**, 1, pp. 221-230.
- Villeneuve P. (2007), Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances*, **25**, 6, pp. 515-536.
- Vougioukalakis G. C., Grubbs R. H. (2010), Ruthenium-Based Heterocyclic Carbene-Coordinated Olefin Metathesis Catalysts. *Journal of the American Chemical Society*, **110**, 3, pp. 1746-1787.
- Vuorela S. (2005). Ph. D. Thesis. In University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- Vuorela S., Meyer A. S., Heinonen M. (2003), Quantitative analysis of the main phenolics in rapeseed meal and oils processed differently using enzymatic hydrolysis and HPLC. *European Food Research and Technology*, **217**, 6, pp. 517-523.

- Vuorela S., Meyer A. S., Heinonen M. (2004), Impact of Isolation Method on the Antioxidant Activity of Rapeseed Meal Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 26, pp. 8202-8207.
- Wakamatsu, D., Morimura, S., Sawa, T., Kida, K., Nakai, C., & Maeda, H. (2005), Isolation, identification, and structure of a potent alkyl-peroxyl radical scavenger in crude canola oil, canolol. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **69**, 8, pp. 1568-1574.
- Walter Fidler W. E. P., A. E. Wasserman, R. D Doerr (1967), Thermal Decomposition of Ferulic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **15**, 5, pp. 757–761.
- Wanasundara U., Amarowicz R., Shahidi F. (1994), Isolation and identification of an antioxidative component in canola-meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 6, pp. 1285-1290.
- Wang, X.-Y., Yang, D., Zhang, H., Jia, C.-H., Shin, J.-A., Hong, S. T., Lee, Y.-H., Jang, Y.-S., & Lee, K.-T. (2014), Antioxidant Activity of Soybean Oil Containing 4-Vinylsyringol Obtained from Decarboxylated Sinapic Acid. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **91**, 9, pp. 1543-1550.
- Wijesundera, C., Ceccato, C., Fagan, P., & Shen, Z. (2008), Seed roasting improves the oxidative stability of canola (*B. napus*) and mustard (*B. juncea*) seed oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 4, pp. 360-367.
- Yang, M., Zheng, C., Zhou, Q., Liu, C.-S., Li, W., & Huang, F.-H. (2014), Influence of Microwaves Treatment of Rapeseed on Phenolic Compounds and Canolol Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **62**, 8, pp. 1956-1963.

- Zacchi P., Eggers R. (2008), High-temperature pre-conditioning of rapeseed: A polyphenol-enriched oil and the effect of refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 2, pp. 111-119.
- Zago E., Durand E., Lecomte J., Barouh N., Villeneuve P., Aouf C. (2015a), Synthesis of Lipophilic Antioxidants by a Lipase-B-Catalyzed Addition of Peracids to the Double Bond of 4-Vinyl-2-methoxyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **63**, 41, pp. 9069-9075.
- Zago E., Lecomte J., Barouh N., Aouf C., Fulcrand H., Carre P., Fine F., Villeneuve P. (2015b), Influence of rapeseed meal treatments on its total phenolic content and composition in sinapine, sinapic acid and canolol. *Industrial Crops and Products*, **76**, pp. 1061-1070.
- Zheng, C., Yang, M., Zhou, Q., Liu, C.-S., & Huang, F.-H. (2014), Changes in the content of canolol and total phenolics, oxidative stability of rapeseed oil during accelerated storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **116**, 12, pp. 1675-1684.